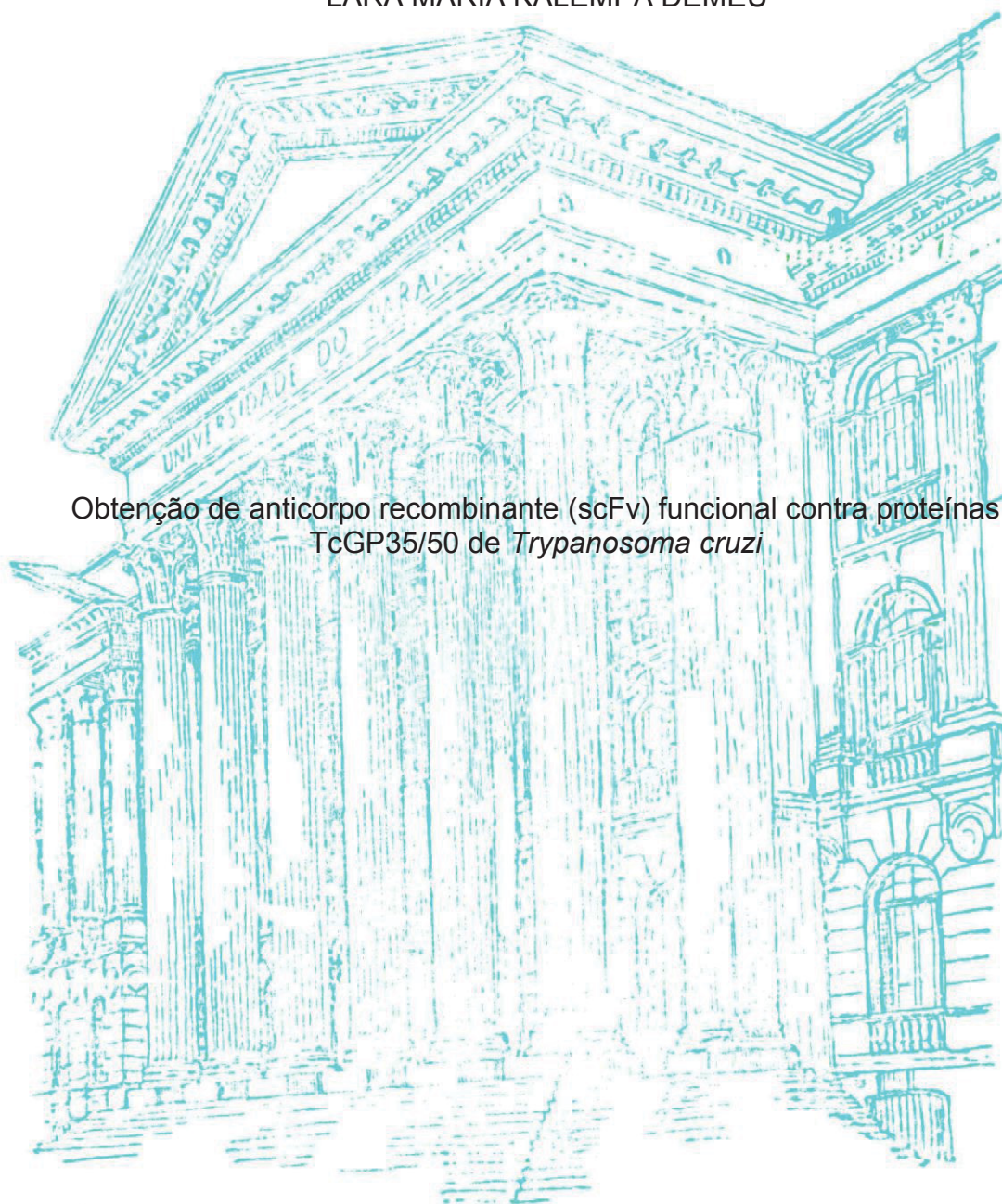


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LARA MARIA KALEMPA DEMEU



Obtenção de anticorpo recombinante (scFv) funcional contra proteínas
TcGP35/50 de *Trypanosoma cruzi*

CURITIBA

2018

LARA MARIA KALEMPA DEMEU

Obtenção de anticorpo recombinante (scFv) funcional contra proteínas
TcGP35/50 de *Trypanosoma cruzi*

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Ciências - Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Wanderson Duarte da Rocha
Co-orientadora: Profa. Dra. Larissa Magalhães Alvarenga

CURITIBA

2018

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Telma Terezinha Stresser de Assis –CRB/9-944)

Demeu, Lara Maria Kalempa

Obtenção de anticorpo recombinante (scFv) funcional contra proteínas TcGP35/50 de *Trypanosoma cruzi*. / Lara Maria Kalempa Demeu. – Curitiba, 2018.

101 p.: il. ; 30cm.

Orientador: Wanderson Duarte da Rocha

Co-orientadora: Larissa Magalhães Alvarenga

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica.

1. *Trypanosoma cruzi*. 2. Imunoglobulinas. I. Título. II. Rocha, Wanderson Duarte da. III. Alvarenga, Larissa Magalhães. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica.

CDD (20. ed.) 574.293



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS
(BIOQUÍMICA)

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS (BIOQUÍMICA) da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **LARA MARIA KALEMPA DEMEU** intitulada: **Obtenção de anticorpo recombinante (scFv) funcional contra proteínas TcGP35/50 de *Trypanosoma cruzi***, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 06 de Agosto de 2018.

WANDERSON DUARTE DA ROCHA

Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

DANIELA FIORI GRADIA

Avaliador Externo (UFPR)

RICARDO ANDREZ MACHADO DE AVILA

Avaliador Externo (UNESC)

SHEILA MARIA BROCHADO WINNISCHOFER

Avaliador Interno (UFPR)

Dedico esse trabalho a todos os pós-graduandos que passaram e que irão passar por essa experiência transformadora.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador **Dr. Wanderson Duarte da Rocha**, por ter me dado a oportunidade, por estar muito presente durante esses quatro anos, por me ajudar em todas as etapas desse trabalho, por me ajudar na adaptação ao novo ambiente e pelas inúmeras conversas de apoio e incentivo que tivemos mesmo eu achando o contrário.

À minha co-orientadora **Dra. Larissa Alvarenga**, por me receber e abrir seu Laboratório para que eu pudesse realizar alguns experimentos, por estar ao meu lado durante esse período e me ajudar no que precisei.

À Dra. **Nobuko Yoshida** por ter cedido gentilmente cDNA derivado de linhagens hibridoma expressando anticorpos monoclonais previamente caracterizados que deram origem ao objeto de estudo desta tese.

Aos meus pais **José Carlos e Lizete**, que mesmo que ninguém saiba dos problemas familiares que enfrentamos nesses quatro anos, me ajudaram a passar por isso e chegar até aqui me dando força e incentivo nos inúmeros momentos que pensei em desistir.

Ao **Rodrigo Jahn Soares** pelo seu carinho, presença e compreensão durante esses anos que estive meio ausente e por toda a ajuda que me deu durante algumas fases do trabalho.

Aos **colegas do Laboratório GFP**, Laiane, Letícia, Normanda, Izadora, Lisandro, Bruno, José Luis, e Kelin pela ajuda em diversos experimentos e pela convivência agradável que ajudava nos dias mais difíceis.

As **colegas do Laboratório de Imunoquímica**, Rafaela, Alessandra, Sabrina, Carla e Isabel por me receberem com carinho, pela convivência muito divertida com vocês e por tudo que me ajudaram nos experimentos que eu nunca tinha feito.

As **ICs** Ana Carolina e Daiana que me ajudaram em muitas etapas do trabalho sendo mais uma mão ajudando a agilizar alguns experimentos.

Ao **Núcleo de Fixação Biológica de Nitrogênio**, pela infraestrutura que nos disponibilizou para realizar os experimentos.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Ciências – Bioquímica**, pela oportunidade de crescimento profissional e pessoal.

As **agências de fomento**, CAPES, CNPq e Fundação Araucária, pela concessão de bolsa de estudo e por financiar todo o trabalho.

A Faculdade Campo Real, em especial a colega **Valéria Avanzi**, que me deu a oportunidade de começar e chegar onde eu gostaria, a docência, e ter sido compreensiva durante esses meses finais do doutorado.

A todos os **técnicos** do Departamento de Bioquímica e Patologia Básica da Universidade que ajudaram com reagentes e materiais necessários para que os experimentos acontecessem.

E por último, não menos importante, a **Deus**, por me acolher, mesmo que minha fé ficasse abalada por alguns momentos, me atender e ouvir minhas lamentações em minhas orações.

*"Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas
lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que
deveria ser, mas Graças a Deus,
não sou o que era antes".*

(Martin Luther King)

RESUMO

A doença de Chagas é causada pelo *Trypanosoma cruzi* e está distribuída em vários países principalmente na América Latina, afetando cerca de 8 milhões de pessoas. Os tratamentos atualmente disponíveis são considerados ineficazes por existirem cepas naturalmente resistentes a esses medicamentos e os critérios de cura não serem efetivos, além disso apresentam diversos efeitos colaterais. Existem diversas formas de transmissão da doença e apesar de vários programas de controle do vetor (inseto barbeiro) essa é ainda a principal forma de contágio. Devido a persistência de várias espécies transmissoras do vetor no ambiente domiciliar e peridomiciliar se faz necessário buscar alternativas de controle que interfiram na proliferação ou na infectividade de formas invasivas presentes no inseto, ou no tratamento de indivíduos com alta parasitemia. Nesse sentido, o objetivo do trabalho é desenvolver anticorpos recombinantes que tenham potencial aplicação na interferência do ciclo de vida do parasito no inseto ou no hospedeiro mamífero. Neste sentido, foi visto que proteínas de superfície como as mucinas (gp35/50) e transialidases (gp82) que participam no processo de adesão e invasão das células possibilitando o estabelecimento da infecção e isso torna candidatos para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para o tratamento da doença. Assim, o gene sintético scFv-10D8 previamente construído obtido a partir do mAb-10D8 (anti-gp35/50) foi clonado e expresso em *E. coli* com proteína de fusão 6xHis (pET22b). Após otimização das condições de indução e enriquecimento de uma fração periplasmática contendo scFv-10D8, foi demonstrado que a proteína recombinante é capaz de reconhecer as mesmas proteínas identificadas pelo mAb-10D8. O ensaio de invasão de células de mamíferos utilizando fração periplasmática ou purificada de scFv10D8 e de um scFv não relacionado foi realizado. Os resultados mostram uma redução específica e dose dependente na taxa de infecção de células expostas a formas tripomastigotas metacíclicos pré-incubados com scFv-10D8. Diante dos resultados apresentados acredita-se que o scFv-10D8 possa ser usado na paratransgênese no inseto vetor evitando disseminação de formas infectivas. Além disso nesse trabalho, as regiões variáveis de IgG das cadeias leves e pesadas de hibridomas que expressam mAb 2B10 (anti-TcGP35/50), e mAb 3F6 (anti-TcGP82) foram sequenciados e montados como scFv. A síntese e produção desses novos scFvs ampliarão as possibilidades de uso dessas moléculas sozinhas ou combinadas com scFv-10D8, associadas ou não a moléculas efetoras (p.ex. peptídeos líticos ao parasito) para controle do parasito no inseto.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*, mAb-10D8, scFv-10D8, anticorpos recombinantes

ABSTRACT

Chagas' disease is caused by *Trypanosoma cruzi* and is distributed in several countries mainly in Latin America, affecting about 8 million people. The currently available treatments are considered ineffective because there are naturally resistant strains of these drugs and the cure criteria are ineffective. In addition, there are several side effects. There are several forms of transmission of the disease and despite several vector control programs (Triatomine bug) this is still the main form of contagion. Due to the persistence of several vector transmitting species in the home and peridomiliary environment, it is necessary to search for control alternatives that interfere in the proliferation or infectivity of the invasive forms present in the insect or in the treatment of individuals with high parasitemia. In this sense, the objective of the work is to develop recombinant antibodies that have potential application in the interference of the cycle in the insect or in the treatment of Chagas' disease. In this sense, it was seen that surface proteins such as mucins (gp35/50) and transialidases (gp82) that participate in the process of adhesion and invasion of the cells allowing the establishment of infection and this makes them candidates for the development of new therapeutic strategies for the treatment of the disease. Thus, the previously constructed synthetic gene scFv-10D8 obtained from mAb-10D8 (anti-gp35/50) was cloned and expressed in *E. coli* with 6xHis fusion protein (pET22b). After optimization of the induction and enrichment conditions of a periplasmic fraction containing scFv-10D8, it was demonstrated that the recombinant protein is able to recognize the same proteins identified by mAb-10D8. The mammalian cell invasion assay using periplasmic or purified fraction of scFv10D8 and an unrelated scFv was performed. The results show a specific and dose-dependent reduction in the infection rate of cells exposed to metacyclic trypomastigote forms preincubated with scFv-10D8. In view of the presented results, it is believed that the scFv-10D8 can be used in the paratransgênese in the vector insect avoiding dissemination of infective forms. Furthermore, in this work, the light and heavy chain IgG variable regions of hybridomas expressing mAb 2B10 (anti-TcGP35 / 50), and mAb 3F6 (anti-TcGP82) were sequenced and assembled as scFv. The synthesis and production of these new scFvs increase the possibilities of using these molecules alone or combined with scFv-10D8, associated or not with effector molecules (eg lithic peptides to the parasite) to control the parasite in the insect.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*, mAb-10D8, scFv-10D8, Recombinant antibodies

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: CICLO BIOLÓGICO DO <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i>	23
FIGURA 2: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS ESTRUTURAS DA FORMA EPIMASTIGOTA.....	24
FIGURA 3: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS MOLÉCULAS DE SUPERFÍCIE PRESENTES EM UM TRIPOMASTIGOTA METACÍCLICO DE <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> INTERAGINDO COM RECEPTORES DE UMA CÉLULA HOSPEDEIRA.	30
FIGURA 4: CARACTERÍSTICAS DA PROTEÍNA MASP	32
FIGURA 5: DIFERENTES ESTRUTURAS COMPOSTAS POR FRAGMENTOS DE ANTICORPOS....	37
FIGURA 6: MODELO ESQUEMÁTICO DA CONSTRUÇÃO DO PLASMÍDEO PET32::scFv10D856	
FIGURA 7: CONSTRUÇÃO E EXPRESSÃO DO <i>INTRABODY</i>	57
FIGURA 8: REPRESENTAÇÃO BIDIMENSIONAL NO FORMATO COLAR DE PÉROLAS IMGT DO GENE DO scFv-10D8	60
FIGURA 9: ESTRUTURA 3D DO scFv-10D8	63
FIGURA 10: PREDIÇÃO DE AMINOÁCIDOS PARTICIPANTES DO ACOPLAMENTO	64
FIGURA 11: EXPRESSÃO, SOLUBILIDADE E REATIVIDADE DO scFv-10D8.....	66
FIGURA 12: EFEITO DA PRÉ-INCUBAÇÃO DE TRIPOMASTIGOTAS METACÍCLICOS (MT) COM scFv-10D8 NA INVASÃO DE CÉLULAS LLC-MK2.....	69
FIGURA 13: IMAGENS OBTIDAS DE ENSAIOS DE INVASÃO CÉLULAS LLC-MK2 POR FORMAS METACÍCLICAS PRÉ-INCUBADAS, OU NÃO COM scFv-10D8.....	70
FIGURA 14: EXPRESSÃO E SOLUBILIDADE DO PET32-scFv-10D8.....	71
FIGURA 15: MODELO ESQUEMÁTICO DA CONSTRUÇÃO DOS PLASMÍDEOS.....	73
FIGURA 16: PERFIL DE RESTRIÇÃO ENZIMÁTICA DE CLONES DA CONSTRUÇÃO DO PLASMÍDEO	73
FIGURA 17: MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA DOS PARASITOS DE CEPA G DE T. CRUZI EXPRESSANDO OS PLASMÍDEOS TRANSFECTADOS	78
FIGURA 18: EXPRESSÃO DO <i>INTRABODY</i>	78
FIGURA 19: AMPLIFICAÇÃO DE PORÇÕES VARIÁVEIS PESADA E LEVE DE OUTROS ANTICORPOS MONOCLONAIS	80
FIGURA 20: REPRESENTAÇÃO BIDIMENSIONAL NO FORMATO COLAR DE PÉROLAS IMGT DO GENE DO scFv-2B10 E scFv-3F6.....	81
FIGURA 21: PREDIÇÃO DA ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL COMPARATIVA DO scFv-10D8,- 2B10 E -3F6.....	83

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: NOMENCLATURA DAS DTU DE T. CRUZI DE ACORDO COM ZINGALES ET AL. 2009.....	25
TABELA 2: VETORES PLASMIDIAIS UTILIZADOS E PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS	45
TABELA 3: INICIADORES UTILIZADOS PARA AMPLIFICAR E SEQUENCIAR AS CADEIAS VARIÁVEIS LEVE E PESADA DO ANTICORPO MONOCLONAL 10D8	47
TABELA 4: TABELA DE ENERGIAS DE ACOPLAMENTO <i>IN SILICO</i> ENTRE MOLÉCULAS DE GLICOSE E SCFV-10D8	63

LISTA DE ABREVIATURAS

Amp – Antibiótico ampicilina

BSA – Albumina sérica bovina

CaCl₂ – Cloreto de cálcio

cDNA – DNA complementar

CDR – Região determinante de complementariedade

DEAE cellulose – Dietilaminoetil celulose

DNA – Ácido desoxiribonucleico

DTT - Ditionitrito

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

ELISA – Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

Gal_f – Galactofuranose

Gal_p – Galactopiranosose

GFP – *Green Fluorescent Protein* - Proteína Fluorescente Verde

gp35/50 ou TcSMUGS – Glicoproteína de peso 35 e 50 kDa

GST – Glutathione-S-transferase

HAT - hipoxantina, aminopterina e timidina

HRP - *Horseradish* peroxidase

IMGT - International Immunogenetics Information System - IMGT/DomainGapAlign

IPTG - Isopropil β-D-1-tiogalactopiranosideo

Kan – Antibiótico Kanamicina

KCl – Cloreto de potássio

KOAc – Acetato de potássio

LB – Meio de cultivo Luria Bertani

LIT – Meio de cultura infuso de fígado triptose

LLC-MK2 - Rhesus Monkey Kidney Epithelial Cells

mAb – Anticorpo monoclonal

OD₆₀₀ – Densidade óptica no comprimento de onda de 600 nm

PBS – Tampão fosfato-salina

PBS-G – PBS acrescido de glicose 2%

PBS-T – PBS acrescido de Tween 20

PCR – Reação em cadeia da polimerase

PEG – Polietilenoglicol

Pen/Strep – Antibiótico combinado penicilina e estreptomicina

PVDF – Fluoreto de polivinilideno

RNA – Ácido ribonucleico

RPM – Revoluções por minuto

RPMI – Roswell Park Memorial Institute medium

scFv – Single chain fragment variable - anticorpo de cadeia única

SDS – Dodecil sulfato de sódio

SFB – Soro fetal bovino

SOB – Super Optimal Broth, caldo super ideal

SOC – Repressão de catabólitos é composto pelo meio SOB com adição de glicose

TAU – Triatomine Artificial Urine

TBE – Tampão composto de Tris, ácido bórico e EDTA

U – Unidade

Zeo – antibiótico Zeomicina

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	17
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1.	DOENÇA DE CHAGAS	19
2.2.	BIOLOGIA DO <i>Trypanosoma cruzi</i>	21
2.3.	INTERAÇÃO <i>Trypanosoma cruzi</i> – CÉLULA HOSPEDEIRA	26
2.4.	ANTICORPOS RECOMBINANTES E SUAS APLICAÇÕES	34
3.	JUSTIFICATIVA	42
4.	OBJETIVO GERAL	43
5.	MATERIAL E MÉTODOS	44
5.1.	ESTIRPES BACTERIANAS	44
5.2.	CULTIVO DE ORGANISMOS	44
5.2.1.	BACTÉRIAS	44
5.2.2.	PARASITOS	45
5.3.	VETORES	45
5.4.	HIBRIDOMA 10D8	46
5.5.	CONSTRUÇÃO DO scFv-10D8	46
5.6.	REPRESENTAÇÃO BIDIMENSIONAL E PREDIÇÃO DA ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DE ANTICORPOS	47
5.7.	ENSAIO DE RESTRIÇÃO ENZIMÁTICA DO DNA	48
5.8.	ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE	48
5.9.	LIGAÇÃO DE FRAGMENTOS DE DNA	49
5.10.	PREPARAÇÃO DE CÉLULAS DE <i>E. coli</i> COMPETENTES E TRANSFORMAÇÃO	49
5.11.	OBTENÇÃO DE DNA PLASMIDIAL	50
5.12.	EXPRESSÃO DO scFv-10D8	50
5.13.	EXTRAÇÃO DO CONTEÚDO PERIPLASMÁTICO E CITOPLASMÁTICO DE BACTÉRIAS QUE EXPRESSAM O scFv-10D8	51
5.14.	VISUALIZAÇÃO DE PROTEÍNAS POR PESO MOLECULAR POR SDS-PAGE E COLORAÇÃO DE GEL	52

5.15.	WESTERN BLOTTING DO PERFIL DE EXPRESSÃO E REATIVIDADE DO scFv-10D8 COM EXTRATOS PROTÉICOS TOTAIS DE PARASITOS	52
5.16.	ENSAIO DE INVASÃO DE CÉLULAS DE MAMÍFEROS (LLC-MK2) COM TRIPOMASTIGOTAS METACÍCLICOS PURIFICADOS DE CEPA G DE <i>T. cruzi</i>	54
5.17.	CONSTRUÇÃO E EXPRESSÃO DO PLASMÍDEO pET32a-10D8	55
5.18.	PRODUÇÃO DE scFv-10D8 NO FORMATO DE <i>intrabody</i>	56
6.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
6.1.	ANÁLISE <i>IN SILICO</i> DO scFv-10D8: IDENTIFICAÇÃO DO POSSÍVEL SÍTIO DE ACOPLAMENTO DO ANTICORPO À gp35/50	58
6.2.	EXPRESSÃO DO scFv-10D8 RECOMBINANTE PARA AVALIAÇÃO DO RECONHECIMENTO	65
6.3.	ENSAIO DE INVASÃO EM CÉLULAS DE MAMÍFERO	66
6.4.	TENTATIVAS DE OTIMIZAÇÃO DA EXPRESSÃO DO scFv-10D8.....	71
6.5.	BLOQUEIO DA INVASÃO PELA EXPRESSÃO <i>INTRABODY</i> scFv-10D8...	74
6.6.	OBTENÇÃO DOS FRAGMENTOS DAS REGIÕES VARIÁVEIS DE OUTROS ANTICORPOS MONOCLONAIS.....	78
7.	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	85
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87
9.	ANEXOS	99

1. INTRODUÇÃO

A doença de Chagas, causada pelo protozoário hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*, é considerada uma doença negligenciada que afeta cerca de 8 milhões de pessoas no mundo todo sendo a maioria na América Latina (WHO, 2018). No Brasil o levantamento obtido em 2010 mostrou que esse número é um pouco mais de 1 milhão de pessoas infectadas (Brazilian Consensus on Chagas Disease, 2015). A infecção por esse protozoário acontece por meio dos dejetos contendo as formas infectivas presentes no inseto vetor hematófago (hospedeiro invertebrado) conhecido popularmente como barbeiro (família *Reduviidae*) para o mamífero (hospedeiro vertebrado). Outras formas de infecção podem acontecer via acidentes de laboratório, transfusão de sangue, transmissão vertical, sexual e oral (NÓBREGA *et al.*, 2009; ARAÚJO *et al.*, 2017; RIOS *et al.*, 2018).

Pessoas infectadas apresentam uma fase aguda que pode ser assintomática e evoluir para a fase crônica com complicações cardíacas, digestivas ou mistas (30% dos indivíduos infectados). As drogas disponíveis para tratamento (Benznidazol e Nifurtimox) possuem resultado mais satisfatório no início da infecção sendo a eficácia questionável na fase crônica da doença e apresentando diversos efeitos colaterais graves e tratamento prolongado. Além disso, existem estudos mostrando cepas de *T. cruzi* que apresentam resistência aos medicamentos comumente utilizados (RASSI E LUQUETTI, 1992; FILARDI E BRENER 1987).

Diante deste cenário se faz necessário o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas no tratamento da doença de Chagas como o desenvolvimento de vacinas e novas formas de tratamento que aumente sua eficiência em eliminar o parasito diminuindo os efeitos colaterais. Além disso, o desenvolvimento de estratégias moleculares que visem interferir com a transmissão vetorial em regiões de alta transmissão é uma alternativa importante. Os anticorpos monoclonais (mAb) constituem moléculas interessantes que tem sido usado em terapias de doenças não infecciosas (câncer) e infecciosas (vírus do dengue) dependendo de sua origem (murina ou humana) e de seu alvo. Além disso, os mAbs podem ser utilizados em ferramentas para detecção de antígenos de patógenos. Apesar de toda potencialidade e capacidade de produção de forma ilimitada dos mAbs, sua produção a partir de hibridomas é dispendiosa e bastante laboriosa.

Uma alternativa ao uso de mAb, é desenvolvimento de anticorpos recombinantes que mantêm a especificidade e afinidade a um custo bem mais baixo. Um dos formatos mais comuns de anticorpos recombinantes é o scFv (*single-chain variable fragment*) em que apenas as regiões que incluem as porções variáveis da cadeia leve e da pesada são expressas na forma de molécula única, ou seja, uma proteína de fusão que mantém a capacidade de interação com o antígeno original.

Este cenário nos impulsionou a desenvolver/engenheirar moléculas ligantes baseadas em mAb que interagem com a superfície de *Trypanosoma cruzi* e que tenham capacidade de interferir no ciclo de vida do parasito, ou seja, moléculas ligantes que alvejem a superfície podem interferir com a interação parasito-hospedeiro (vertebrado ou invertebrado). Tais moléculas poderão ser utilizadas em estratégia de bloqueio da transmissão, ou tratamento.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. DOENÇA DE CHAGAS

A doença de Chagas ou também conhecida por tripanossomíase americana é causada pelo protozoário flagelado que parasita o sangue e os tecidos de vertebrados, *Trypanosoma cruzi* (CHAGAS, 1909). Esse parasito pertence à ordem *Kinetoplastida* e família *Trypanosomatidae* que engloba outros protozoários como o *Trypanosoma brucei* e *Leishmania* spp. Juntos, esses parasitos e entre outros constituem as doenças negligenciadas. Estima-se que 8 milhões de pessoas estejam afetadas com a doença e se faz presente em 21 países da América Latina (WHO, 2018). Contudo devido às migrações tem afetado diversas regiões do globo, como Europa e Estados Unidos (STRASEN *et al.*, 2014; TANOWITZ *et al.*, 2011; COURA E VIÑAS 2010). Estima-se que mais de 10 mil pessoas morram todos os anos de manifestações clínicas da doença de Chagas, e mais de 25 milhões de pessoas correm o risco de adquirir a doença (WHO, 2018).

No Brasil houve alteração da situação da doença de Chagas, através de mudanças nas ações e estratégias de vigilância prevenção e controle por meio da adoção de um novo modelo de vigilância epidemiológica. Em função dessas ações o Brasil recebeu em 2006 o Certificado Internacional pela Interrupção da Transmissão da doença de Chagas pelo *Triatoma infestans* (principal vetor responsável da transmissão na época) que na década de 70, se estimava ser responsável por 80% das infecções humanas. Porém apesar de controlado a transmissão vetorial, acredita-se que haja no Brasil, atualmente, pelo menos um milhão de pessoas infectadas por *T. cruzi*. (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018). Ainda existe os casos de surtos por transmissão oral, vetorial domiciliar sem colonização e vetorial extradomiciliar, principalmente na Amazônia Legal. Entre os anos de 2007 e 2016 foram registrados casos confirmados da doença em vários estados brasileiros tendo em média 200 casos anuais, sendo a região Norte do país, a responsável pelo maior número de casos. As principais formas prováveis de transmissão no Brasil foram por transmissão oral cerca de 69% dos casos devido aos surtos. Além disso, 9% por transmissão vetorial e em 21% não foi identificada a forma de transmissão (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018; MANOEL-CAETANO E SILVA, 2007).

A transmissão vetorial da doença ocorre principalmente pelo inseto vetor da ordem Hemiptera, família *Reduviidae* e subfamília *Triatominae*, sendo os gêneros *Triatoma*, *Rhodnius* e *Panstrongylus*, também conhecidos popularmente como barbeiro. A transmissão acontece durante ou após a picada em que os insetos eliminam seus dejetos no hospedeiro vertebrado após o repasto sanguíneo eliminando em suas fezes as formas tripomastigotas metacíclicas e que penetram pelo orifício da picada ou por solução de continuidade deixada pelo ato de coçar. Há ainda outras formas de transmissão da doença como por exemplo pela ingestão de alimentos contaminados com ocorrência de surtos episódicos, transfusões sanguíneas, devido a migração de indivíduos infectados para centros urbanos, transplante de órgãos, transmissão congênita em que muitos bebês tem morte prematura e ainda não se sabe qual a influência da doença e acidentes laboratoriais em menor número (MONCAYO E SILVEIRA, 2009; SCHOFIELD, 2000).

A doença se apresenta em três fases, a aguda, a indeterminada e a crônica. A fase aguda pode passar despercebida pois os sintomas que apresentam são inespecíficos e podem ser confundidos com outras doenças. A fase aguda é definida como o período durante o qual os parasitos podem ser encontrados facilmente no sangue. A gravidade da infecção depende também de outros fatores, entre os quais a virulência do parasito e a suscetibilidade do paciente afetado. Este pode entrar em uma fase de latência ou indeterminada em que não apresenta sintomas importantes e pode durar vários anos. Muitos dos pacientes que se encontram nessa fase desconhecem sua real condição de portador da doença e isso leva a transmitir os poucos parasitos presentes na circulação por diversos mecanismos, e essa condição pode durar o resto de suas vidas. Uma pequena parcela da população de infectados (~30%) que se encontram nessa fase podem evoluir para a fase crônica durante a qual se identifica sintomas cardíacos (miocardite grave) com aumento do volume do coração ou do trato digestivo. Muitos pacientes chegam a essa fase sem o devido tratamento, estima-se que apenas 0,5% da população receba o tratamento adequado, o qual se torna muito comprometido e pode ser fatal (DIAS, 2006; RASSI *et al.*, 2000).

Outra situação que exige atenção são casos de co-infecção *T. cruzi* e HIV e o aumento de transplantes de órgãos sólidos e de células tronco hematopoiéticas.

Nesses casos os receptores portadores da doença de Chagas são submetidos a imunossupressão constante e isso faz com que ocorram casos de reativação da doença de Chagas crônica. Estudos mostraram que a doença de Chagas poderia ter comportamento oportunista em indivíduos soropositivo em fase avançada (ALMEIDA *et al.*, 2009, ROCHA *et al.*, 2006).

Em pacientes com co-infecção *T.cruzi*/HIV a reativação da doença aparece de forma grave e ocorre em 79% dos casos no sistema nervoso central e em 25% afeta o miocárdio (SARTORI *et al.*, 1995, FERREIRA *et al.*, 1997, GALHARDO *et al.*, 1999). Podem acometer outros órgãos como trato gastrointestinal, pericárdio (SARTORI *et al.*, 1999). Os casos de reativação da doença estão associados a alta taxa de mortalidade, pois os indivíduos acometidos vão a óbito antes ou durante o tratamento (FERREIRA *et al.*, 1997, SARTORI *et al.* 2007, RIVERA *et al.*, 2004).

O tratamento da doença de Chagas se restringe apenas em duas drogas atualmente disponíveis, o nifurtimox e o benzonidazol. Esses medicamentos utilizados logo no início da infecção impedem complicações crônicas, porém a eficácia de ambos medicamentos na fase crônica é muito questionada. As principais limitações das drogas são a necessidade de tempos longos de tratamento e diversos efeitos colaterais como toxidez ao sistema nervoso central, leucopenia, fraqueza muscular e dermatite severa, podendo apresentar também efeito carcinogênico (ALSFORD *et al.*, 2013). Foi encontrado também falhas terapêuticas provavelmente relacionado a sensibilidade aos medicamentos que as populações de parasitos podem apresentar na Américas do Sul e Central (ANDRADE *et al.*, 1996; PONTES *et al.*, 2010).

2.2. BIOLOGIA DO Trypanosoma cruzi

Uma das formas de transmissão da doença se dá através das excretas dos triatomíneos (barbeiro). Durante o repasto sanguíneo esses insetos defecam eliminando formas infectantes, tripomastigotas metacíclicas, em seus dejetos (fezes e urina) e essas formas podem penetrar na pele por solução de continuidade como coçar o local da picada. As formas infectivas podem invadir uma variedade de células de mamíferos *in vivo* e *in vitro* incluindo fibroblastos, células epiteliais, células endoteliais e neurônios tendo preferência por células do sistema fagocítico

mononuclear. Dentro dessas células, ocorre redução drástica do flagelo e passam a ser denominadas amastigotas, que se multiplicam por divisão binária em ciclos de 12 horas até que a célula hospedeira fique completamente tomada por parasitos (DE SOUZA, 2002). Nesse momento as amastigotas se transformam novamente em tripomastigotas e quando a célula se rompe as formas tripomastigotas estão livres e deslocam para infectar novas células hospedeiras se disseminando pela corrente sanguínea.

Os triatomíneos ao se alimentarem de sangue de indivíduos ou animais infectados podem ingerir as formas tripomastigotas, e essas formas são convertidas em epimastigotas no tubo digestivo do inseto vetor. As epimastigotas são formas replicativas (divisão binária) e quando chegam na porção terminal do intestino (reto) se transformam em tripomastigotas metacíclicas, que são formas altamente móveis e infectivas que estão presentes nas excretas do vetor completando o ciclo (FIGURA 1).

A forma amastigota, é um estágio intracelular replicativo que está presente na fase crônica da doença. A forma epimastigota é encontrada no tubo digestivo do vetor e não é infectante para os vertebrados. Possui flagelo e membrana ondulante. E as formas tripomastigotas, fase extracelular, que circula no sangue. As tripomastigotas sanguíneas e a forma presente no sangue do hospedeiro mamífero e é o estágio que o inseto pode se infectar. E as formas tripomastigotas metacíclicas são formas encontradas no dejeito do inseto vetor. Apresenta flagelo e membrana ondulante em toda a extensão lateral do parasito. Esse estágio evolutivo está presente na fase aguda da doença, constituindo a forma infectante para os vertebrados (DE SOUZA, 2002).

Este parasito possui o cinetoplasto que é uma organela citoplasmática presente nos tripanosomatídeos, que se assemelha estrutural e funcionalmente a única mitocôndria que existe. Está relacionado ao fornecimento de energia para a movimentação do flagelo. Além disso possui microtúbulos subpeliculares associados a membrana plasmática conferindo rigidez ao protozoário (DE SOUZA, 2002) (FIGURA 2).

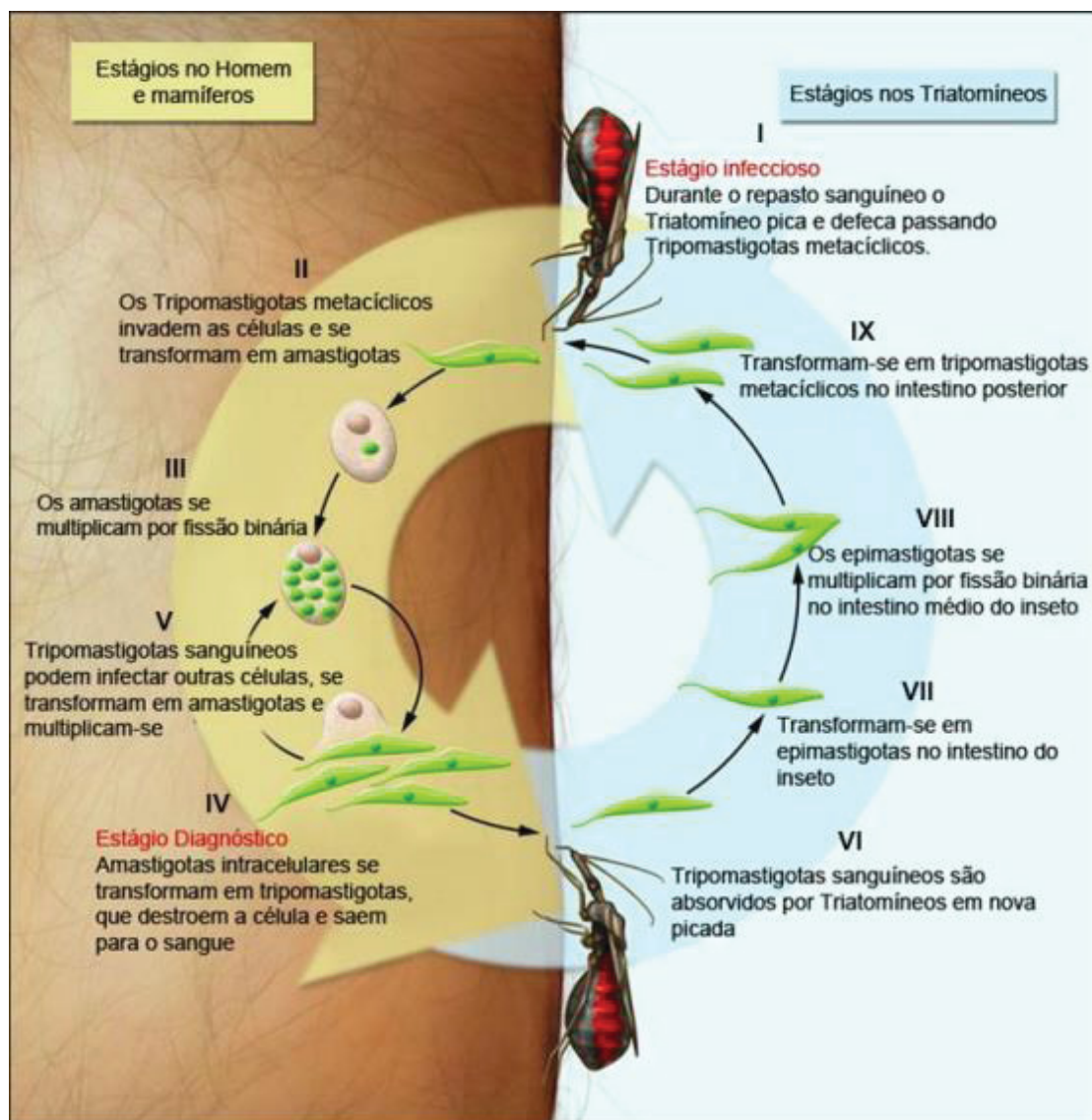


FIGURA 1: Ciclo biológico do *Trypanosoma cruzi*

FONTE: STUART *et al.*, 2008.

NOTA: O inseto triatomíneo infectado ao sugar o sangue do mamífero libera pelas fezes formas *tripomastigotas metacíclicas* próximo ao local da picada. Estas formas adentram o organismo hospedeiro pela lesão ocasionada pela picada do barbeiro ou por mucosas intactas, como a conjuntiva 1. Dentro do mamífero, as *tripomastigotas metacíclicas* invadem as células próximas ao local de incursão, onde se diferenciam em formas *amastigotas* 2. As *amastigotas* se multiplicam por fissão binária 3, e diferenciam-se em formas *tripomastigotas* e são então liberadas na corrente sanguínea como *tripomastigotas sanguíneas* 4. Estas formas infectam diversos tecidos e transformam-se em *amastigotas intracelulares*, nos locais de infecção. As manifestações clínicas podem ser resultado deste ciclo infeccioso. As formas *tripomastigotas sanguíneas* não se replicam diferentemente de *T. brucei*. A replicação ocorre somente quando o parasito adentra uma célula ou é ingerido pelo inseto. O hospedeiro invertebrado contamina-se ao sugar sangue de mamíferos que contenham parasitas circulantes 5. As formas *tripomastigotas* ingeridas diferenciam-se em *epimastigotas* no intestino médio do inseto 6. Os parasitos multiplicam-se no intestino médio 7, e diferenciam-se em formas *tripomastigotas metacíclicas* (infectantes) no intestino posterior 8. O parasito *T. cruzi* também pode ser transmitido por transfusões sanguíneas, transplante de órgãos, infecção transplacentária, acidentes laboratoriais e alimentos contaminados.

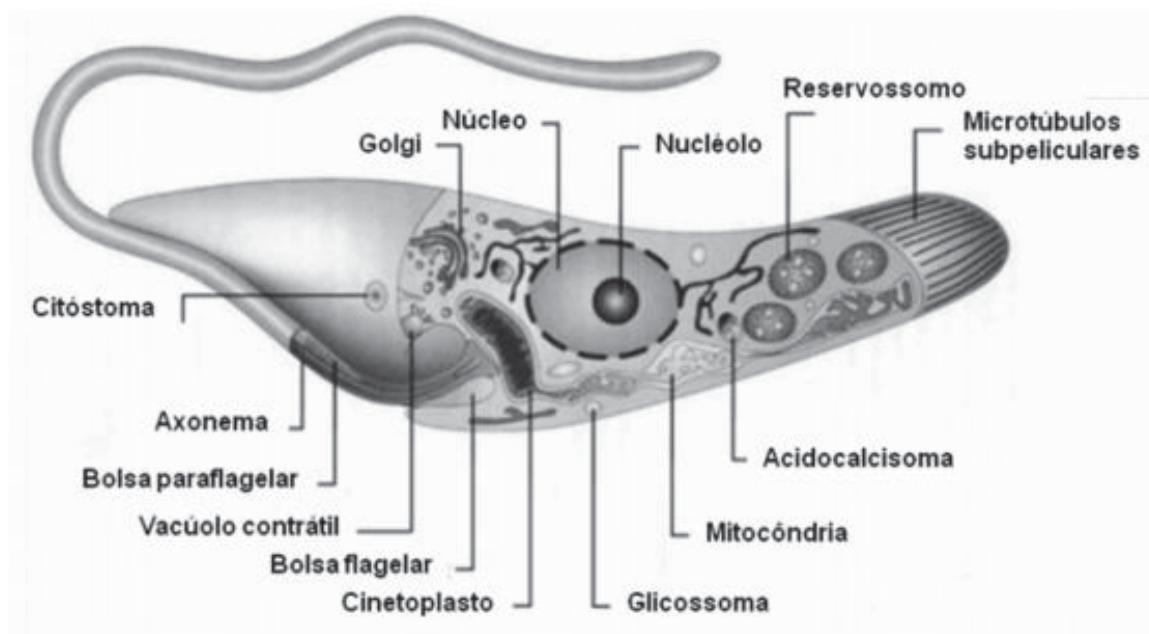


FIGURA 2: Representação esquemática das estruturas da forma epimastigota.

FONTE: Souza, 2008.

NOTA: Modelo esquemático visualizado por microscopia eletrônica de transmissão de organelas presentes na forma evolutiva epimastigota de *T. cruzi*.

T. cruzi apresenta uma grande variabilidade de populações que tem sido evidenciadas por diversas técnicas moleculares, como análise do DNA do cinetoplasto (MOREL *et al.*, 1980), DNA *fingerprinting* (MACEDO *et al.*, 1992), DNA polimórfico amplificado randomicamente – RAPD (TIBAYRENC *et al.*, 1993, STEINDEL *et al.*, 1993), análise de DNA mitocondrial (FREITAS *et al.*, 2006) entre outras. Características fenotípicas e genotípicas foram empregadas para dividir as espécies do parasito em duas grandes linhagens (*T. cruzi* I e *T. cruzi* II) (ANONYMOUS, 1999). A recomendação do Segundo Encontro Satélite para atualização das linhagens de *T. cruzi* designa que cepas do parasito devem ser referidas com DTU (*Discrete typing units* – Unidades de Tipagens Distintas) de TcI a TcIV de acordo com Zingales *et al.* (2009) (TABELA 1).

Tabela 1: Nomenclatura das DTU de *T. cruzi* de acordo com Zingales et al. 2009.

DTU	Abreviação	Equivalência do <i>T. cruzi</i> pelas antigas denominações
<i>T. cruzi</i> I	TcI	<i>T. cruzi</i> Ia ^{a,b} e DTU Ic ^c
<i>T. cruzi</i> II	TcII	<i>T. cruzi</i> II ^a e DTU IIb ^c
<i>T. cruzi</i> III	TcIII	Z3/Z1 ASAT ^d , Z3-A ^e , DTU IIc ^c e <i>T. cruzi</i> III ^f
<i>T. cruzi</i> IV	TcIV	Z3 ^d , Z3-B ^e e DTU IIa ^c
<i>T. cruzi</i> V	TcV	Boliviano Z2 ^d , rDNA 1/2 ^g , clone 39 ^h e DTU IIId ^c
<i>T. cruzi</i> VI	TcVI	Paraguaio Z2 ⁱ , Zimodema B ^j e DTU IIe ^c

a: Anonymous 1999; b: Falla et al. 2009; c: Brisse et al. 2000; d: Miles et al. 1981; DTU: unidades de tipagem distintas; e: Mendonça et al. 2002; f: Freitas et al. 2006; g: Souto et al. 1996; h: Tibayrenc e Ayala 1991; i: Chapman et al. 1984; j: Carneiro et al. 1990.

Com a nova classificação do *T. cruzi* em grupos foi observado possíveis correlações entre a cepa infectante e características imunológicas, epidemiológicas e patológicas da doença (ZINGALES *et al.*, 2009).

Já foi visto em outros trabalhos as diferenças existentes entre cepas do parasito como tropismo tecidual, cepas mais infectivas, nível de parasitismo sanguíneo e também variabilidade biológica em estudos de susceptibilidade a drogas, em que autores (ANDRADE *et al.*, 1985, 1992; TOLEDO *et al.*, 2003) observaram diferenças entre a resistência aos quimioterápicos em que cepas do grupo *T. cruzi* I apresentaram um grau mais elevado de resistência em relação ao grupo *T. cruzi* II. Pacheco e Brito (1999) demonstraram que o parasito pode ter grande capacidade de adaptação ao ambiente que se encontra podendo o parasito ser composto de populações geneticamente heterogêneas (TIBAYRENC E AYALA, 1988).

O parasito possui uma bicamada lipídica que separa o meio intracelular do meio extracelular atuando de forma altamente seletiva. A membrana plasmática possui várias proteínas em sua superfície sendo composta principalmente de proteínas, fosfolipídeos (fosfatidilcolina fosfatidiletanolamina e fosfatidilinositol) e glicocálice. Esse glicocálice é constituído pelos carboidratos que está projetado para fora da célula e que está associado com proteínas e lipídeos, formando as glicoproteínas e glicolipídeos, essas estruturas estão envolvidas com a sobrevivência e infectividade do parasito. Estudos mostraram que os componentes

são distribuídos em diferentes quantidades entre as formas evolutivas do parasito (PREVIATO *et al.*, 2004; BUSCAGLIA *et al.*, 2006).

T. cruzi possui glicoconjugados em sua superfície que contém um domínio carboidrato que sugere relação com a virulência do parasito. O glicoconjugado mais abundante do *T. cruzi* é a sialoglicoproteínas (semelhantes a mucinas). As glicoproteínas, glicolipídeos e âncoras glicosilfosfatidilinositol (GPI) possuem carboidratos em sua estrutura e que recobrem a superfície da célula, sendo o carboidrato considerado um mediador para a interação entre o parasito e a célula. Além disso esses carboidratos podem ser úteis para a utilização como marcadores para diagnósticos específicos, vacinas, quimioterapias e estudo de mecanismos de evasão do sistema imune (SCHENKMAN *et al.*, 1993; ACOSTA-SERRANO *et al.*, 2001; YOSHIDA *et al.*, 1990).

2.3.INTERAÇÃO *Trypanosoma cruzi* – CÉLULA HOSPEDEIRA

Após a entrada do *T. cruzi* no hospedeiro vertebrado as formas tripomastigotas metacíclicas podem infectar vários tipos celulares, como fibroblastos, macrófagos e células epiteliais, essas são as principais devido ao seu local de inoculação (TYLER E ENGMAN, 2001). O parasito utiliza de várias etapas para invadir a célula hospedeira, como adesão, sinalização e invasão. Inicialmente acontece a adesão do parasito à superfície da célula e todas as formas evolutivas do parasito se aderem variando o grau de adesão de acordo com a cepa. A complexidade das etapas difere entre os estágios infectivos do parasito (tripomastigotas metacíclicos ou sanguíneas) pois seus repertórios de moléculas são diferentes bem como o tipo de célula alvo (YOSHIDA E CORTEZ, 2008). A adesão ocorre devido a um processo de reconhecimento celular entre glicoproteínas e proteínas presentes na superfície do parasito e da célula hospedeira (DE PABLOS *et al.*, 2011; DE PABLOS E OSUNA, 2012). Na etapa de invasão da célula alvo diversas moléculas na superfície da membranas de formas infectivas são recrutadas além de proteases e sinalizadores são utilizados para interagir com as vias de sinalização e penetrar na célula hospedeira (BURLEIGH E WOOLSEY, 2002), ou seja, os tripomastigotas ao entrarem em contato com receptores presentes na célula

disparam uma cascata de sinalização que induz a liberação de cálcio no meio intracelular (MORENO *et al.*, 1994; CALER *et al.*, 2000; SCHARFSTEIN *et al.*, 2000). Com o nível de cálcio alterado ocorre a entrada gradual do parasito na célula pois acontece um rearranjo de actina (RODRÍGUEZ *et al.*, 1995) acontece também a fusão dos lisossomos com a membrana plasmática, formando um vacúolo derivado da membrana celular da célula hospedeira (RODRÍGUEZ *et al.*, 1997). Também tem descrito na literatura a participação de fosfatases durante a invasão (ARAYA *et al.*, 2008, GALLO *et al.*, 2011) e liberação de óxido nítrico tanto pela célula hospedeira quanto pelo parasito parece estar envolvida com a infecção (CARVALHO *et al.*, 2012). Outra molécula que está envolvida na interação do parasita com a célula hospedeira é a transialidase, que são expressas em formas tripomastigotas e ancoradas por glicosilfosfatidilinositol (GPI). Essa molécula de superfície pertence a um grupo de famílias multigênicas com atividade enzimática e liberada no meio extracelular, que variam de 100 a 200 kDa (BARROS *et al.*, 1996). A transialidase funciona transferindo os sialoconjugados do hospedeiro para β -galactoses da porção n-terminal dos glicoconjugados do parasito, o qual é incapaz de sintetizar ácido siálico (PREVIATO *et al.*, 1985). É dentro do vacúolo parasitóforo que os tripomastigotas liberam as transialidases que irão remover o ácido siálico da membrana do vacúolo e isso faz com que a membrana se torne permeável a ação de um peptídeo (TcTox) que tem homologia com o fator 9 do sistema complemento humano causando formação de poros levando a ruptura na membrana (ANDREWS *et al.*, 1990; LEY *et al.*, 1990; SOUZA *et al.*, 2010). Estudos de invasão de células mostraram que formas tripomastigotas de cepas que possuem alta taxa de expressão dessa proteína, apresentaram melhor capacidade de invasão em relação a cepas que possuíam baixa taxa de expressão de transialidases (PRIOLI *et al.*, 1990; PEREIRA *et al.*, 1996). Esse processo de captação de ácido siálico pelo parasito fornece resistência ao sistema complemento humano e pode ser um fator indispensável para estabelecimento da infecção (PEREIRA-CHIOCCOLA *et al.*, 2000).

As proteínas mais encontradas na superfície do *T. cruzi* são membros da família das transialidases e das mucinas (FIGURA 3). Essas duas famílias de proteínas correspondem aproximadamente 5% do genoma do parasito. As mucinas

estão envolvidas na incorporação do ácido siálico do hospedeiro, que foi transferido anteriormente pela atividade das Transialidases (FRASCH, 2000). A supefamília das Transialidases foi dividida em quatro grupos (COLLI, 1993; FRASCH, 2000; EL-SAYED *et al.*, 2005), e são pertencentes do grupo I aquelas que apresentam atividade enzimática ativa. O grupo II compreende proteínas com atividade enzimática inativa e possui membros como gp85, TSA-1, gp90. Essas proteínas ainda são capazes de se ligarem ao ácido siálico e a resíduos de galactose, também estão relacionadas com ancoragem a substratos ou a superfícies celulares (FRASCH, 2000). O grupo III compõem proteínas que tem atividade regulatória sendo envolvida na interrupção das vias do sistema complemento (FREITAS *et al.*, 2011). O grupo IV possui genes que codificam antígenos de superfície de formas tripomastigotas, porém ainda continuam desconhecidos maiores detalhes desse grupo (FRASCH, 2000). A glicoproteína gp83 pertence a família das transialidases e é encontrada em todas as cepas de *T. cruzi* utilizada pelo parasito para aderir e invadir células fagocitárias e não fagocitárias, expressa apenas nas formas infectantes (VILLALTA *et al.*, 2008).

A gp82 é outra proteína encontrada na superfície do parasito e está presente somente nas formas tripomastigotas metacíclicas. Possui oligossacarídeos N-ligados e ancorada na membrana por GPI (RAMIREZ *et al.*, 1993). Acredita-se que a porção glicídica da proteína não esteja envolvida na invasão e seu sítio de adesão esteja no domínio central da molécula (SANTORI *et al.*, 1996; MANQUE *et al.*, 2000). A proteína faz com que dispare a via de sinalização de cálcio na célula hospedeira quando acontece a adesão do parasito além de possuírem as proteínas quinases e as fosfolipases ativas. Esta molécula também intervém na fosforilação proteica no resíduo de tirosina, necessário para a invasão (YOSHIDA, 2006; FAVORETO *et al.*, 1998). Em estudos com infecção *in vivo* com formas metacíclicas inoculadas oralmente em camundongo, mostraram que o parasito tem capacidade de invadir o epitélio da mucosa gástrica e a gp82 é mediadora desse processo (HOFT *et al.*, 1996; NEIRA *et al.*, 2003).

A gp90 também é expressa nas formas tripomastigotas metacíclicas. Ao contrário da gp82, essa molécula se liga na célula hospedeira sem induzir a ativação de vias de sinalização de cálcio (MAEDA *et al.*, 2012), uma vez que a ligação dessa

glicoproteína às células de mamíferos não ativa essa via de sinalização (RUIZ *et al.*, 1998). Dados da literatura demonstraram que a proteína gp90 é sensível a digestão por pepsina isso explica a maior capacidade de invadir células do trato gastrointestinal em infecções via oral, devido a proteólise dessa molécula (CORTEZ *et al.*, 2006).

Outro grupo que compõe as proteínas mais abundantes do *T. cruzi* são as do tipo mucinas. Essas proteínas são ancoradas à membrana também por GPI e contém em sua composição açúcares O-ligados a resíduos de treonina ou serina através de uma N-acetilglicosamina (SCHENKMAN *et al.*, 1993). Essas moléculas também participam do processo de evasão do sistema imune do hospedeiro (BUSCAGLIA *et al.*, 2006). Estão presentes em epimastigotas e tripomastigotas e diferem entre si apenas na porção lipídica da âncora GPI e possuem a mesma porção glicídica e dependendo da cepa do parasito, as moléculas de mucina contém resíduos de galactofuranose e galactopirranose e esses resíduos interagem com as células do hospedeiro mamífero (ACOSTA-SERRANO *et al.*, 1995; YOSHIDA *et al.*, 1989). Além disso elas também são aceptores de ácido siálico transferidos de glicoconjugados do hospedeiro na reação pela transialidase (YOSHIDA, 2006).

Dentre as proteínas do tipo mucinas, destaca-se a gp35/50, que está presente abundantemente na superfície de formas tripomastigotas metacíclicas de diferentes cepas de *T. cruzi* e participa do processo de invasão da célula (TEIXEIRA e YOSHIDA, 1986). A gp35/50 desencadeia a cascata de sinalização que mobiliza cálcio intracelular no parasito e na célula alvo (RUIZ *et al.*, 1998). Porém menos eficiente que gp82 na invasão celular pois mobiliza menos sinalização de cálcio. O cálcio necessário à invasão celular é liberado pelos acidocalcissomos, organela com capacidade de transportar prótons e cálcio (DOCAMPO *et al.*, 1995 revisto por DOCAMPO *et al.*, 2005; revisto por De SOUZA, 2008). Essas moléculas aparentemente medeiam a invasão pelo recrutamento de filamentos de actina que pode estar associado com ativação de adenilil ciclase, que gera AMPc. A internalização do parasito parece ocorrer por dependência do citoesqueleto da célula hospedeira mediado por endocitose (FERREIRA *et al.*, 2006) (FIGURA 3).

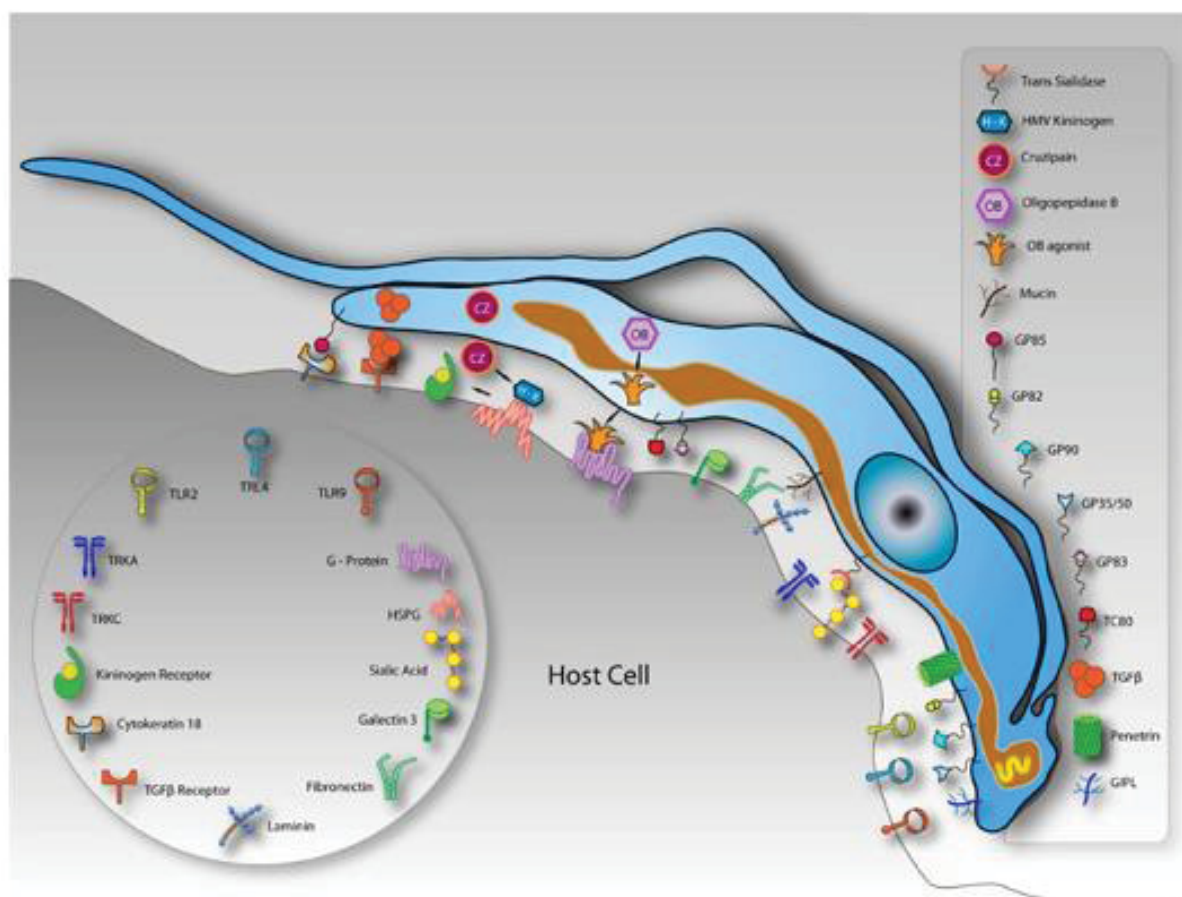


FIGURA 3: Representação esquemática das moléculas de superfície presentes em um tripomastigoto metacíclico de *Trypanosoma cruzi* interagindo com receptores de uma célula hospedeira.

FONTE: BARRIAS *et al.*, 2013.

NOTA: Tripomastigotas apresentam uma multiplicidade de moléculas envolvidas no processo de interação com células de mamíferos, sendo o reconhecimento receptor-ligante essencial para a entrada deste patógeno intracelular obrigatório. Na superfície do *T. cruzi* se encontra gp35/50, gp85, gp82, gp90 entre outras. Na figura se observa uma transialidase captando ácido siálico da célula hospedeira.

O parasito possui outras proteínas de superfície que podem estar envolvidas com a invasão do parasito na célula hospedeira. Uma delas são as proteínas de superfície associadas à mucina (MASP). Essas moléculas formam uma das famílias mais amplas de genes presentes do parasito e recebe esse nome pois seus genes estão associados na grande maioria das vezes aos genes que codificam para mucinas (EL-SAYED *et al.*, 2005a; BARTHOLOMEU *et al.*, 2009). Essa família é a segunda maior do *T. cruzi* e a primeira em diversidade de sequência entre seus genes e possui cerca de 1377 membros correspondendo a aproximadamente 6% do

genoma do parasito. Ensaios de imunofluorescência mostraram que uma pequena parte de parasitos expressam na sua superfície, membros contendo um determinado peptídeo que está presente em um subgrupo da proteína e isso levanta a hipótese que a expressão na população de parasitos é heterogênea (BARTHOLOMEU *et al.*, 2009). Foram descritas em formas tripomastigotas e tripomastigota metacíclicas (DE PABLOS *et al.*, 2011) e caracteriza por apresentar uma região central altamente variável e repetitiva rica em resíduos de treonina e serina e domínios N e C terminais altamente conservados, que correspondem a um peptídeo sinal e um sítio de adição a âncora de GPI (FIGURA 4), respectivamente. Este padrão sugere uma possível localização na superfície do parasito (BARTHOLOMEU *et al.*, 2009). Sua função ainda não foi elucidada, mas por suas características de variabilidade de sequência, localização na superfície acredita-se que possa desempenhar papel na interação do parasito com a célula hospedeira. Foi também demonstrado que um membro da família (MASP52) é capaz de induzir a endocitose em células não fagocitárias (DE PABLOS *et al.*, 2011) e com isso sugere-se que as MASP poderiam estar envolvidas com processos de adesão, infecção e sobrevivência na célula hospedeira. MASP também poderia estar envolvida com a evasão do sistema imune do hospedeiro. Proteínas que expressam peptídeos repetitivos se utilizam desse mecanismo, e a infecção pelo *T. cruzi* induz a produção de anticorpos contra várias proteínas contendo sequências repetitivas. A expressão conjunta de membros de famílias multigênicas como MASP e transialidases poderiam construir o mecanismo de evasão da resposta imune HOFT *et al.*, 1989; ATWOOD *et al.* 2005; EL SAYED *et al.*, 2005).

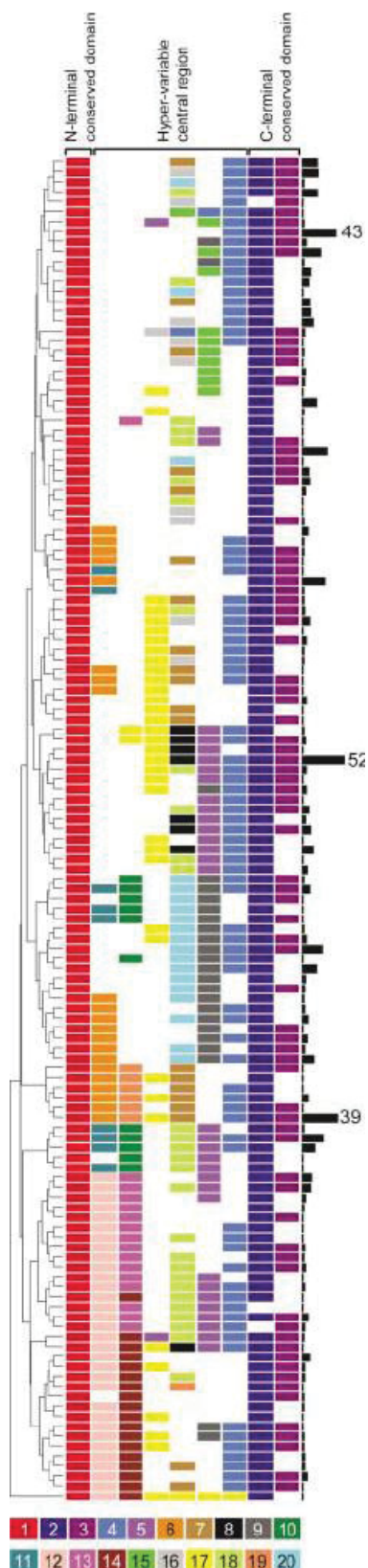


FIGURA 4: Características da proteína MASP

FONTE: EL SAYED *et al.*, 2005.

NOTA: Representação esquemática da estrutura e variabilidade apresentada pela proteína MASP. O MEMEalgorithm (versão 3.0) foi usado para identificar motivos compartilhados por membros da família MASP. Os números relativos em cada um dos subgrupos definidos são representados como um histograma à direita. Os domínios conservados N e C terminal e a região variável central estão indicados no topo da figura. Como os padrões de comprimento variável causam lacunas e são divididos por MEMEinto em dois ou mais motivos separados, o domínio conservado no C terminal de MASP é representado por dois motivos separados por resíduos de leucina e valina repetidos de forma variável. As seqüências de consenso do motivo são numeradas em ordem decrescente de significância estatística e codificadas por cores. Extraído e adaptado de El Sayed *et al.*, 2005.

As manifestações clínicas que encontramos no paciente portador da doença de Chagas ocorre devido a resposta imune elaborada pelo hospedeiro contra o parasito. Para cada fase da infecção acontece uma resposta imune específica com células e citocinas tentando eliminar o protozoário. No início da infecção experimental são observados eventos ocorridos pela imunidade inata do hospedeiro e posterior uma resposta específica que combina a participação de células T CD4+ e T CD8+, produção de anticorpos, indução de citocinas por várias populações de linfócitos e a ativação de macrófagos (GARG *et al.*, 1997). Na infecção inicial ocorre um aumento significativo no soro de citocina Fator de Necrose Tumoral-alfa (TNF- α), Interferon-gama (IFN- γ) e de óxido nítrico (NO) e em seguida seus níveis são altamente reduzidos (TARLETON, 2007). Além disso, células da imunidade inata como macrófagos e células dendríticas agem detectando e eliminando o parasito. Estas células desempenham vários papéis como apresentadoras de antígeno capazes de desencadear uma resposta imune adaptativa. O sistema imune inato também tem o papel de reconhecer as células não hematopoiéticas infectadas que representa um dos alvos do *T. cruzi* (TARLETON, 2007). As células NK também estão presentes na imunidade inata, limitando o crescimento parasitário e desenvolvendo a imunidade adquirida (SCOTT e TRINCHIERI, 1995). A invasão de macrófagos, leva à secreção de IL-12, que ativa as células NK a produzirem IFN- γ (ALIBERTI *et al.*, 1996) que age sobre os macrófagos para sua atividade microbicida (GAZZINELI *et al.*, 1992). Na infecção aguda há ativação de linfócitos B com produção elevada de imunoglobulinas. O aparecimento de anticorpos específicos está relacionado com a queda da parasitemia (NORRIS *et al.*, 1994). Trabalhos tem demonstrado a existência de anticorpos que estão associados com um estado de proteção do hospedeiro, que agem em formas vivas do parasito induzindo a lise por Complemento (KRETTLI E BRENER, 1982).

T. cruzi por ter um ciclo de vida que permite se adaptar a diferentes ambientes seja o inseto vetor ou no hospedeiro mamífero desenvolveu diversos mecanismos que pudesse sobreviver nesses ambientes e continuar se multiplicando, como a expressão de moléculas em sua superfície que interfira na ativação das vias clássica e alternativa do Complemento (OUAISSI *et al.*, 2005; DOSREIS, 2011). O parasito ainda possui outros métodos de evasão da resposta imune como a renovação de moléculas de sua superfície através de vias endocíticas fazendo com que o parasito consiga se livrar de anticorpos aderidos a sua membrana como ocorre para a proteína de superfície variante (VSG) de *T. brucei* (STERNBERG, 2004; RUSSO *et al.*, 1994). Há também a liberação de imunocomplexos ligados à membrana mediada por clivagem de glicoproteínas ancoradas através de âncoras de GPI, mediada por fosfolipases.

Existem alguns trabalhos mostrando a produção de mAb que reconheçam as proteínas de superfície do *T. cruzi*. Já foi demonstrado a produção de mAbs para proteínas de superfície, entre elas proteínas do tipo mucina como a gp35/50 reconhecido pelo mAb 10D8 e 2B10 (YOSHIDA, 2006). Experimentos utilizando o mAb 10D8 em ensaios de *western blotting*, contra extratos totais de tripomastigotas metacíclicos de diferentes cepas, mostraram um perfil de duas bandas correspondente a proteína testada (MORTARA *et al.*, 1992). A utilização de mAb-10D8 diminuiu a infectividade em camundongos por formas metacíclicas que foram pré-tratadas com o anticorpo monoclonal ou fragmentos Fab (YOSHIDA *et al.*, 1989), indicando que a ligação do desse mAb reduzir a infecção por formas metacíclicas do parasito no hospedeiro. Esses resultados reforçam que os anticorpos podem ser uma alternativa a ser explorada para o bloqueio ou redução da infecção pelo *T. cruzi*.

2.4. ANTICORPOS RECOMBINANTES E SUAS APLICAÇÕES

Os anticorpos constituem uma importante ferramenta que visa a neutralização e a eliminação de antígenos. O hospedeiro vertebrado sintetiza e secreta uma ampla diversidade de anticorpos com elevado grau de afinidade e especificidade a uma variedade de ligantes (CHAMES *et al.*, 2009; WESOLOWSKI *et al.*, 2009). Devido a

essas características, os anticorpos vêm sendo empregados como ferramentas para o desenvolvimento de kits diagnósticos, pesquisas biotecnológicas em imunoterapia e em *drug-delivery* (VINCKE E MUYLDERMANS, 2012).

Após os avanços de produção de anticorpos monoclonais (mAb) através do hibridoma por Köhler e Milstein (1975), os métodos e estratégias para a produção evoluíram muito, trazendo para esse campo a manipulação genética. Sendo suas principais características, especificidade, homogeneidade e produção em larga escala. A produção de mAb envolve a fusão de linfócitos B de animais pré imunizados com o antígeno de interesse, e células neoplásicas em crescimento (mieloma múltiplo). A fusão do linfócito B com as células do mieloma dá origem as células chamadas de hibridomas (KÖHLER E MILSTEIN, 1975). Com a relativa facilidade de manipulação e o aumento de informações a respeito de sua estrutura e função aliada a versatilidade de construção de configuração do sitio de ligação ao antígeno fizeram as imunoglobulinas elevar seu valor econômico e se tornarem modelo de estudo para gerar imunoderivados com ação farmacológica e de interação molecular (FILPULA, 2007; MARASCO E SUI, 2007). Mesmo a tecnologia do hibridoma permitindo a produção de mAb, que interagem com um único epítopo, diferentemente dos anticorpos policlonais que interagem com diversos, o tempo de produção e custos elevados limitam o uso dessa técnica (CABILLY *et al.*, 1984). Outro problema enfrentado é a aplicação clínica, pois mAb podem apresentar dificuldade de penetração no tecido, reações adversas a proteína de origem não humana, em que a imunogenicidade de anticorpos murinho estimulam uma resposta humoral no indivíduo levando a produção de anticorpos humanos anticamundongo – HAMA (Human Anti-Mouse Antibody) (ZHANG *et al.*, 2009; DE MARCO, 2011). Para tentar contornar essa situação, uma possibilidade seria a humanização dos anticorpos pela fusão de regiões variáveis das cadeias leve e pesada de anticorpo de camundongo com domínios constantes da imunoglobulina humana ou pela inserção das CDRs murinas em cadeias variáveis humanas para aumentar a efetividade e segurança da imunoterapia (MORAIS *et al.*, 2014).

Com o avanço das técnicas de DNA recombinante permitiu desenvolver moléculas recombinantes de anticorpos artificiais que tem comportamento similaridêntico ao anticorpo original, permitindo ser construído de forma de

fragmentos polipeptídicos que mantêm o sítio de ligação ao antígeno. Esses anticorpos recombinantes podem ser expressos como fragmentos Fab (HUST *et al.*, 2007), fragmentos Fv cujos domínios são unidos por forças não covalentes (SKERRA E PLÜCKTHUN, 1988), e também mais comumente produzida e utilizada o fragmento de cadeia única das regiões variáveis do anticorpo (scFv) com cerca de 25 kDa e suas cadeias leve e pesada são unidas por um peptídeo flexível conector (BRÍGIDO E MARANHÃO, 2002) (FIGURA 5).

Outra evolução é a de produção de anticorpos recombinantes em sistema procarioto, a utilização de vetores que permitem a secreção de anticorpos expressos no periplasma, ambiente oxidante que ajuda na correta formação das pontes dissulfeto contribuindo para o correto enovelamento da proteína além de conseguir produzir em grande quantidade e de forma homogênea (SKERRA E PLÜCKTHUN, 1988; BETTER *et al.*, 1998). Esse formato de scFv apresenta vantagens como manter o sítio de ligação ao antígeno, tamanho da molécula reduzido comparado ao convencional. Em estudos clínicos apresenta melhor penetração, depuração plasmática mais rápida, menor retenção em tecidos não alvos e menor imunogenicidade (RENARD *et al.*, 1997; ADAMS *et al.*, 1998 AHMAD *et al.*, 2012). Outras alternativas utilizando o scFv como referência de anticorpos de tamanho reduzido é para a produção de anticorpos com a mesma especificidade fusionados formando moléculas bivalentes ou multivalentes (KIM *et al.*, 2008; PEREZ *et al.*, 2006) e moléculas de especificidade diferentes foram fusionados em moléculas biespecíficas (LIU *et al.*, 2009).

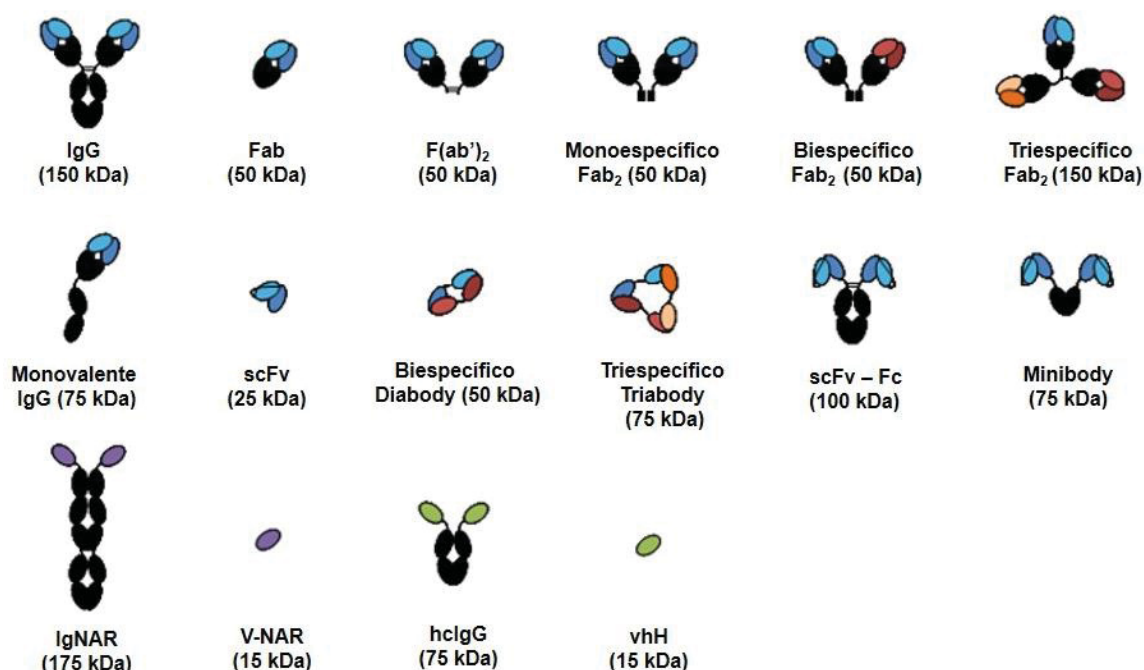


FIGURA 5: Diferentes estruturas compostas por fragmentos de anticorpos.

FONTE: <http://creativebiolabsd.blogspot.com/2015/06/bivalent-and-bispecific-single-hain.html>
(Acessado em 03/06/2018).

NOTA: Diferentes modelos de anticorpos mostrando a composição de suas subunidades ao longo das cadeias das moléculas.

Para a união das cadeias pesada e leve do scFv se faz necessário o uso de um peptídeo conector (*linker*) em que seu comprimento influencia na conformação correta da cadeia polipeptídica. O *linker* deve ter aproximadamente 3,5 nm entre as cadeias para que assim haja a formação do sítio de ligação ao antígeno e sua composição deve ter uma sequência hidrofílica para evitar a intercalação de peptídeo dentro das cadeias variáveis durante o enovelamento da proteína (ARGOS, 1990), sendo composta mais rotineiramente de resíduos de serina e glicina conferindo flexibilidade ao anticorpo (WHITLOW *et al.*, 1993).

Os fragmentos de anticorpos já são empregados para terapias contra o câncer com bons resultados utilizando da vantagem de seu tamanho reduzido para penetrar o tumor. Essas moléculas podem ainda serem utilizadas em imunotoxinas para a entrega de genes terapêuticos, como reagentes de diagnóstico e detecção. Os scFvs ainda podem ser ligados a vários antígenos com haptenos, proteínas,

carboidratos ou a proteínas fluorescentes (DE WILDT *et al.*, 2000; WANG *et al.*, 2014). Existe ainda outros tipos de anticorpos que subdividem em três classes, os murinos, humanizados e quiméricos. Os anticorpos produzidos em camundongos por serem considerados corpos estranhos pelo sistema imune humano podem gerar HAMA (produção de anticorpos humanos anti-murino) e isso pode causar rápida eliminação sendo o principal problema a reação imunogênica gerada pelo organismo devido a presença de moléculas murinas. Utilizando técnicas de biologia molecular e a tecnologia do hibridoma desenvolveram meios de humanizar o anticorpo para tentar minimizar os problemas de reação imunogênica (ROQUE *et al.*, 2004). Ainda tentando minimizar os efeitos do HAMA foram criados anticorpos quiméricos em que o anticorpo apresenta a combinação da região variável do anticorpo murinho com a região constante do anticorpo humano, porém essas moléculas ainda geraram reação imunológica (SANTOS *et al.*, 2006). Para eliminar o máximo de resposta imunogênica, os anticorpos humanizados foram desenvolvidos, ou seja, transferir as CDRs murinas para cadeias variáveis da estrutura de um anticorpo humano, com isso a nova molécula possui afinidade e especificidade para o antígeno alvo mas mantendo as características humanas sem perder a atividade biológica de interesse (MARANHÃO E BRÍGIDO, 2001).

Uma alternativa que vem sendo utilizada para algumas doenças é o uso de moléculas no formato de *nanobodies*, que são derivados de anticorpos de camelídeos que produzem anticorpos que possuem apenas as cadeias pesadas e em que as regiões de reconhecimento antigênico são formadas somente pelo domínio variável da cadeia pesada denominada VHH (HAMERS-CASTERMAN *et al.*, 1993). Esses anticorpos são menores que o scFv para a penetração no tecido, possuem baixa agregação e baixa imunogenicidade, podendo ser obtidos de culturas de microorganismos com bom rendimento e produzindo em alta escala para diversas aplicações biotecnológicas (DE GENST *et al.*, 2006; VINCKE *et al.*, 2009). Assim como o scFv, os *nanobodies* podem ser utilizados no tratamento de diversas doenças, como por exemplo a doença do Sono causada pelo *T. brucei*, que foi desenvolvido um *nanobody* contra glicoproteína de superfície variante (VSG) e foi observado que esse formato de anticorpo possui atividade citotóxica sem sua parte Fc (efetora) e com isso foi suficiente para eliminar o parasito, causando rápida

imobilização do parasito, alargamento da bolsa flagelar e bloqueio da endocitose (STIJLEMANS *et al.*, 2011). Arias e colaboradores (2014) demonstrou que utilizando a *nanobody* com capacidade para ligar, porém incapaz de causar lise no parasito foi utilizado como veículo de moléculas tóxicas, em que uma nanopartícula acoplada ao anticorpo consegue entrar na célula via endocitose e carregar o fármaco para dentro e ter efeito citotóxico. Obishakin e colaboradores (2014) também demonstraram o uso de *nanobodies* desenvolvidos contra proteína paraflagelar para diagnóstico de alguns tripanosomatídeos que causam a Tripanosomíase Africana e verificaram que o anticorpo conseguiu identificar os tripanosomatídeos porém não conseguiram diferenciação entre eles.

Várias doenças que tem transmissão vetorial possui a dificuldade de controle e tratamento, muitas delas se baseiam em medicamentos e inseticidas, o problema dessas abordagens é a ineficiência que não contribuem para a erradicação da doença. Estratégias baseadas em microrganismos estão aumentando sendo um meio alternativo para o controle da doença transmitida por vetores. Esses microrganismos presentes no vetor possuem características úteis que podem ser utilizadas para estratégias de controle como por exemplo a capacidade de disseminação através de populações vetoriais (SALDAÑA; HEGDE; HUGHES, 2017). Foi visto para o *Anopheles* (vetor da Malária) que a rica microbiota parece ser mais resistente a infecções por *Plasmodium* e que determinadas bactérias podem inibir totalmente a formação de formas infectivas, concluindo que essas bactérias têm grande influência na transmissão do parasito (CIRIMOTICH *et al.*, 2011; BOISSIÈRE *et al.*, 2012).

A paratransgênese possui algumas condições para sua realização, como a relação simbiótica estável entre o microrganismo e o vetor, capacidade do simbiote de ser cultivado *in vitro* e ser modificado geneticamente, a manipulação genética não pode afetar o microrganismo nem a capacidade de sobrevivência do vetor, o produto inserido no simbiote deve ser secretado para assegurar completa interação com o alvo, utilizar uma bactéria adequada que não seja patogênica a humanos e animais e formas de introduzir esse microrganismo modificado no campo deve ser idealizado (WANG E JACOBS-LORENA, 2013). Essa técnica apresenta a vantagem que as moléculas inseridas e o simbiote (bactéria ou levedura) podem ser trocados caso não tenha um bom resultado e também que a capacidade máxima de inibição se atinge

quando a molécula é secretada do microrganismo modificado para o lúmen do intestino e isso permite o alcance das moléculas para o alvo no intestino médio do inseto (WANG *et al.*, 2012).

Já existem trabalhos mostrando a aplicação dessa técnica para doença de Chagas, em que se utilizou a bactéria *Rhodococcus rhodnii*, que coloniza o intestino do vetor *Rhodnius prolixus*, para inserir um scFv com Cecropina A (peptídeo) e exibiram atividade inibitória eficaz contra *T. cruzi in vivo* (DURVASULA *et al.*, 1997, 1999). Também foi desenvolvido um método para a dispersão dos microrganismos recombinantes em populações naturais do inseto vetor, em que as ninfas de *Rhodnius prolixus* adquirem *Rhodococcus rhodnii* através de fezes contaminada de adultos. A coprofagia foi explorada como forma de adição das bactérias manipuladas em uma pasta sintética chamada CRUZIGARD que mimetiza as fezes naturais de *R. prolixus*, essa pasta foi atrativa as ninfas com adição de sulfato de amônio estimulando a alimentação do inseto e que foi dispersa como gotícula no meio ambiente (DURVASULA *et al.*, 1997).

Apesar de bons resultados utilizando essa técnica para algumas doenças o gerenciamento de riscos ambientais são desafios associados a essa metodologia, pois não se sabe se simbioses modificados podem substituir em populações de insetos naturais e a instabilidade do DNA introduzido nas bactérias e se os microrganismos de alguns insetos são transformados de forma eficaz (VILLEGAS E PIMENTA, 2014).

O diagnóstico e tratamento de diversas enfermidades tem evoluído com o passar dos anos, os fragmentos de anticorpos surgiram para aumentar a especificidade e efetividade diminuindo agregação menor risco de imunogenicidade e aumentando a aplicabilidade para uma gama maior de doenças como as doenças negligenciadas como é o caso da doença de Chagas podendo combinar esse anticorpos com moléculas líticas ou introduzir em bactérias colonizadoras do intestino do inseto barbeiro e também combinar com antiparasitários para um futuro próximo tratar o indivíduo infectado

O scFv-10D8 reconhece tripomastigota metacíclicos podendo ser utilizado para o desenvolvimento de estratégias de controle do inseto vetor, como modelos já desenvolvidos para *Rhodnius prolixus*, inserindo o anticorpo no simbiote. Essa estratégia ainda pode ser combinada moléculas líticas, como peptídeos, drogas,

polímeros, para potencializar os efeitos nocivos no parasito. A paratransgênese é um método de controle vetorial que testes preliminares para a doença de Chagas mostraram resultados satisfatórios e que ainda se faz necessário mais testes para melhor entendimento dos mecanismos de integração do anticorpo e qual simbiote melhor se adapta ao sistema.

3. JUSTIFICATIVA

A doença de Chagas é um problema de saúde pública e é considerada uma doença negligenciada pela organização mundial da Saúde (WHO). O contato com excretas do inseto vetor (Triatomíneo) durante o repasto sanguíneo libera formas infectivas (tripomastigotas metacíclicas) que invadem as células do hospedeiro mamífero. O benzonidazol é o medicamento de escolha para o tratamento da doença de Chagas, porém causa diversos efeitos colaterais ao paciente e sua eficácia é questionada principalmente em casos crônicos. As proteínas de superfície do parasito têm potencial para desenvolvimento de novas terapias pois podem desempenhar funções importantes na interação parasito com o hospedeiro como adesão, manipulação do ambiente. Entre as proteínas de superfície descritas do *T. cruzi*, destacam-se as glicoproteínas que interagem no processo de invasão celular e permite o estabelecimento da infecção. As gp35/50 e gp82 são proteínas envolvidas no ciclo biológico e são candidatos ao desenvolvimento de estratégias terapêuticas, como controle biológico do inseto vetor, uma vez que já foram descritos anticorpos monoclonais com capacidade de diminuir a infecção e anticorpos em outros formatos (*nanobody*) apresentaram capacidade lítica.

A tecnologia dos anticorpos monoclonais apresenta homogeneidade, alta especificidade e podem ser produzidos ilimitadamente e demanda um extensivo trabalho e tempo. Para manter essas características aliados ainda à produção em larga escala com baixo custo, a engenharia genética tem sido utilizada para obtenção de anticorpos recombinantes, que permite o desenvolvimento de construções que mantenham ou aperfeiçoem as propriedades funcionais de um anticorpo. Entre as construções que podem ser feitas baseadas em anticorpos o fragmento variável de cadeia única (*single-chain variable fragment* - scFv) é o menor fragmento de anticorpo que ainda retém a capacidade de se combinar com o antígeno (KHANTASUP *et al.*, 2015).

Com isso, propõe-se a produção e caracterização funcional de anticorpos recombinantes anti-*T. cruzi* com potencial para bloqueio do ciclo de vida ou diminuição da infecção. Caso esses anticorpos recombinantes não tenham potencial para interferir com o ciclo estes poderão ser utilizados como ferramentas de biologia molecular para detecção das proteínas alvo.

4. OBJETIVO GERAL

Desenvolver anticorpo recombinante funcional anti-*T. cruzi* para interferir com o ciclo de vida e/ou potencial terapêutico na doença de Chagas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

➤ **Parte I – Avaliação do scFv-10D8 quanto a sua eficácia.**

- Avaliar a reatividade do scFv no reconhecimento de proteína nativa em extrato total de formas tripomastigota metacíclicas do parasito da cepa G em ensaios de *western blot*;
- Expressar e purificar em larga escala o scFv-10D8;
- Avaliar o reconhecimento das proteínas de *T. cruzi* em extratos e parasitos intactos em ensaios de *western blotting*;
- Expressar scFvs no próprio parasito para atenuação do próprio parasito;
- Realizar ensaios de bloqueio da invasão por formas metacíclicas em ensaios de infecção *in vitro*;
- Tentar atenuar a virulência de formas infectivas utilizando a estratégia de expressão de *intrabodies*.

➤ **Parte II – Obtenção de scFvs a partir de hibridomas previamente caracterizados**

- Obter scFvs, oriundos de linhagens expressando mAb-2B10, mAb-3F6.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. ESTIRPES BACTERIANAS

Utilizamos estirpes de *E. coli* como Rosetta Gami (uma estirpe derivada da Origami™), aumenta a formação das pontes dissulfeto no citoplasma quando as proteínas heterólogas são expressas em *E. coli* e além dessa, optamos por utilizar a ArcticExpress (DE3) (derivada de estirpe B) que não possuem a protease Lon, que pode degradar proteínas recombinantes, essas cepas são projetadas para serem deficientes para uma segunda protease, a proteína OmpT. Apresentam também o fenótipo Hte, a presença deste fenótipo aumenta a eficiência de transformação das células. O gene que codifica a endonuclease I (endA) foi inativado nesta célula inibindo a degradação do DNA plasmidial. E também foi usado a SHuffle® T7 Express - New England Bio Labs (BESSETTE *et al.*, 1999). Uma célula derivada da estirpe B de *E. coli* modificada para minimizar os problemas de formação de pontes dissulfeto e o mau dobramento das proteínas. As redutases no citoplasma de *E. coli* mantêm cisteínas na sua forma reduzida, reduzindo assim qualquer ponte dissulfeto que possa formar neste compartimento. Essa célula SHuffle tem deleções dos genes de redutase glutarredoxina e tioredoxina redutase que permite a formação de pontes dissulfeto no citoplasma. Esta combinação de mutações é normalmente letal, mas a letalidade é suprimida por uma mutação na enzima peroxiredoxina (New England Bio Labs).

5.2. CULTIVO DE ORGANISMOS

5.2.1. BACTÉRIAS

Foi utilizado o meio Luria Bertani Líquido (LB) ou sólido (LB – Ágar) (SAMBROOK *et al.*, 1989) (triptona 1%, extrato de levedura 0,5%, NaCl 171 mM, pH 7,0 ou acrescido de 1,5% ágar p/v) para cultivar as estirpes bacterianas sob agitação de 170 RPM a temperatura de 37°C e adição de antibiótico de seleção para a resistência de cada bactéria ou plasmídeo introduzido.

5.2.2. PARASITOS

O cultivo de parasitos da cepa G da espécie *Trypanosoma cruzi* formas epimastigotas, foi mantido em meio líquido LIT completo (Infuso de fígado 0,5%; NaCl 75,3 mM; KCl 5,4 mM; glicose 10 mM; bactotriptose 0,5%; Na₂HPO₄ 56,4 mM; hemina 0,0025%; extrato de levedura 15 g/L, 1% de solução com Penicilina 10000 U e estreptomicina 10000 µg - PenStrep – Sigma, além de 10% de SFB – Cultilab - inativado) a temperatura de 28°C (CONTRERAS *et al.*, 1988).

5.3. VETORES

Os vetores plasmidiais utilizados para manipulação, clonagem e expressão foram:

TABELA 2: Vetores plasmidiais utilizados e suas principais características

VETOR	CARACTERÍSTICAS	REFERÊNCIA
pTZ57R/T	Amp ^R , Vetor de clonagem método T/A	Fermentas
pGEM-T easy	Vetor de clonagem possui desoxitimidina (T) e permite a inserção direta de produtos de PCR, Amp ^R	Promega
pUC57-scFv-10D8	Vetor de clonagem, o vetor pUC57-scFv-10D8 foi inserida a sequência do gene de interesse no vetor pUC57 utilizando os sítios e <i>NcoI</i> e <i>NotI</i>	GenScript
pET22b(+)	Vetor de expressão com promotor T7, adiciona sequência <i>pelB</i> líder para direcionar os fragmentos para o periplasma, Amp ^R	Novagen
pET22b(+)-scFv-10D8	Vetor construído através da clonagem do gene do scFv-10D8 purificado do pUC57-scFv-10D8 nos sítios de <i>NcoI</i> e <i>NotI</i> .	SOARES RJ, 2014 (Dissertação de Mestrado)
pTREX::GFP_Neo	Vetor de integração ao genoma de <i>T. cruzi</i> e expressão da proteína verde fluorescente (GFP)	DaROCHA <i>et al.</i> , 2004b
pGAPZ e pGAPZα	Vetores de Sistema de expressão em leveduras com promotor <i>GAP</i> , Zeo ^R	Invitrogen
pET28a	Vetor de expressão com operador lac, Kan ^R	Novagen
pET32a(+)	Vetor de expressão com tag de tiorredoxina que	Novagen

permite melhor dobramento e purificação da proteína

5.4. HIBRIDOMA 10D8

O hibridoma secretor do anticorpo monoclonal 10D8 que deu origem ao scFv-10D8 foi cedido gentilmente pela Prof. Dra. Nobuko Yoshida – UNIFESP. Este hibridoma foi obtido pela imunização de camundongos BALB/C com parasitos mortos da cepa G de *T. cruzi*. Os esplenócitos dos camundongos foram fusionados com células de plasmacitoma P3U1. Os sobrenadantes de hibridoma foram testados por imunofluorescência indireta com parasitos da cepa G utilizados como antígeno. Os hibridoma produtores de anticorpos foram clonados duas vezes por diluição limitante.

5.5. CONSTRUÇÃO DO scFv-10D8

Para a construção do scFv-10D8 foram necessárias etapas como: de extração de RNA do hibridoma 10D8, síntese do cDNA a partir do RNA total do hibridoma 10D8, amplificação dos genes da cadeia variável leve e pesada do anticorpo monoclonal 10D8 utilizando o protocolo descrito por FIELDS *et al.*, 2013. Para a amplificação da cadeia pesada, uma única reação de PCR utilizando os iniciadores VhRevU e VhForU foi necessária. Para a amplificação da cadeia leve, o iniciador universal VkForU deve ser combinado com outros 9 iniciadores reversos, denominados VkRev1–9 para determinar o melhor par para amplificação desta cadeia. Cada uma das cadeias amplificadas foi clonada no vetor pGEM-T Easy e então sequenciada. Os iniciadores utilizados nas reações de PCR estão descritos na TABELA 3. Além disso foram feitos também o sequenciamento dos genes da cadeia variável leve e pesada do anticorpo monoclonal 10D8 pelo métodos de Sanger *et al.* (1977) utilizando os iniciadores M13 *Forward* e M13 *Reverse* e planejamento e síntese do scFv-10D8 pela empresa GenScript que otimizou o gene sintético para expressão heteróloga e inseriu entre os genes uma sequência que codifica um peptídeo flexível composto pelos aminoácidos serina e glicina. Essa sequência otimizada foi sintetizada, clonada no vetor pUC57, e sequenciada pela empresa.

Todas essas etapas aqui citadas foram realizadas por SOARES, RJ. 2014 (Dissertação de Mestrado).

TABELA 3: Iniciadores utilizados para amplificar e sequenciar as cadeias variáveis leve e pesada do anticorpo monoclonal 10D8

Nome	Sequência	Nota
Para amplificação da cadeia pesada:		
VhRevU	GAG GTS MAR CTG CAG SAG TCW GG	Anela na região V _h e é utilizado para amplificar e sequenciar o domínio V _h da IgG.
VhForU	GAC AGT GGA TAR ACM GAT GG	
Para amplificação da cadeia leve-k:		
VkRev1	GAG GTS MAR CTG CAG SAG TCW GG	Anelam nas extremidades da região V _h da cadeia leve-k e são utilizados para amplificar e sequenciar a cadeia leve-k.
VkRev2	GAT ATT GTG ATG ACG CAG GCT	
VkRev3	GAT ATT GTG ATA ACC CAG	
VkRev4	GAC ATT GTG CTG ACC CAA TCT	
VkRev5	GAC ATT GTG ATG ACC CAG TCT	
VkRev6	GAT ATT GTG CTA ACT CAG TCT	
VkRev7	GAT ATC CAG ATG ACA CAG ACT	
VkRev8	GAC ATC CAG CTG ACT CAG TCT	
VkRev9	CAA ATT GTT CTC ACC CAG TCT	
VkForU	GGA TAC AGT TGG TGC AGC ATC	
Para amplificar toda a cadeia leve:		
KappaFor	ATT AAC ACT CAT TCC TGT TGA A	Anela na extremidade 3' da região CI da cadeia leve-k e é utilizado para amplificar e sequenciar o domínio V _l da IgG.

Fonte: Fields et al 2013

5.6. REPRESENTAÇÃO BIDIMENSIONAL E PREDIÇÃO DA ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DE ANTICORPOS

As sequências obtidas de aminoácidos das cadeias leve e pesada do mAb-10D8 foram alinhadas e numeradas de acordo com o padrão IMGT (International Immunogenetics Information System - IMGT/DomainGapAlign). Os resultados do alinhamento foram utilizados para predição das regiões hipervariáveis (CDRs ou local de combinação do anticorpo) e o “colar de pérolas” ou representação bidimensional da estrutura foi obtida com a ferramenta IMGT/Collier-de-Perles utilizando o resultado da predição das CDRs. A predição da estrutura tridimensional foi feita utilizando o Rosetta Web Server (GrayLab at Johns Hopkins University, Baltimore, Maryland) (LYSKOV *et al.*, 2013). As estruturas foram visualizadas no software PyMol - (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0 Schrödinger, LLC). As moléculas glicídicas (galactopirranose e galactofuranose) que foram utilizadas para fazer os ensaios de acoplamento foram construídas a partir do

programa Avogadro (Avogadro: an open-source molecular builder and visualization tool. Version 1.2, <http://avogadro.cc/>) (HANWELL *et al.*, 2012). Os modelos de interações entre o scFv-10D8 e as várias moléculas glicídicas (docking), foram obtidos utilizando o software Hex Protein Docking 8.0 (GHOORAH *et al.*, 2013) seguindo as recomendações do manual do desenvolvedor para refinamento dos resultados, uma vez que sabemos onde se encontra o sítio de ligação não necessitando do programa procurar na molécula inteira. Os prováveis aminoácidos que participam da ligação no sítio de interação e o grau de confiabilidade dessa predição foram observadas utilizando o programa IntFOLD Integrated Protein Structure and Function Prediction Server (MCGUFFIN *et al.*, 2015).

5.7. ENSAIO DE RESTRIÇÃO ENZIMÁTICA DO DNA

Os plasmídeos usados neste trabalho foram submetidos a ensaios de restrição enzimática com enzimas de interesse seguindo as recomendações descritas do catálogo do fabricante (Fermentas).

5.8. ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

Os procedimentos de eletroforese em gel de agarose seguiram descrição de Sambrook *et al.* (1989), utilizando-se tampão TBE 1X (Tris-borato 40 mM; EDTA 1 mM, pH 8,3). As amostras de DNA foram misturadas a 5 µL de tampão de amostra para DNA (azul de bromofenol 0,8%, ficol 10%, xileno cianol 0,4%, SDS 1%, EDTA 1,8 mM) com posterior aplicação nos poços do gel de agarose previamente preparado. A corrida eletroforética ocorreu a 80 mV no sistema de eletroforese Horizon 58 (Gibco-BRL), o gel foi tratado em solução de brometo de etídio (0,5 µg/mL) por 15 minutos. A revelação do gel ocorreu sob incidência de luz ultravioleta em transiluminador EC3 System – UVP BioImaging Systems (UVP, Inc. Upland, CA/USA).

Para a obtenção de fragmentos de DNA após corrida de eletroforese em gel de agarose foi utilizado um kit de purificação (GE Healthcare) seguindo orientação do fabricante.

5.9. LIGAÇÃO DE FRAGMENTOS DE DNA

Para a ligação dos fragmentos de DNA (vetores e insertos) foram utilizados 100 ng do DNA do vetor previamente linearizado e razão molar de 5:1 do DNA do inserto em relação ao vetor, em reação contendo 10% de tampão de enzima T4 ligase e 1% de enzima T4 ligase (Fermentas), incubados a 16°C durante a noite.

5.10. PREPARAÇÃO DE CÉLULAS DE *E. coli* COMPETENTES E TRANSFORMAÇÃO

As células competentes das cepas de *E. coli* ArcticExpress foram preparadas como descrito abaixo. Uma colônia isolada foi inoculada em 5 mL de meio LB e incubada a 37°C sob agitação de 160 RPM por 12 horas. Após este período 5 mL da pré-cultura foi transferido para 10 mL de meio LB com subsequente incubação a 37°C sob agitação de 160 RPM até atingir OD₆₀₀ 0,3 – 0,4. As bactérias foram coletadas por centrifugação refrigerada (4°C) por 10 minutos a 5031 g (Eppendorf Centrifuge 5804 R) e ressuspensas em 10 mL de CaCl₂ gelado e mantidas em gelo durante 30 minutos. Novamente a suspensão foi centrifugada sob refrigeração (4°C) por 10 minutos a 3220 g (Eppendorf Centrifuge 5804 R) e a este sedimento adicionou-se 2 mL de CaCl₂ (85 mM em glicerol 15% p/v) estéril e refrigerado, com subsequente distribuição em alíquotas de 100 µL que foram mantidas em freezer a -80°C.

As alíquotas de células competentes foram mantidas em gelo e a cada tubo contendo o DNA a ser transformado foi adicionado 2 µL de XL10-Gold β-mercaptoetanol diluído 1:10 para aumentar a eficiência da transformação. Em seguida os tubos foram mantidos em gelo por 10 minutos e homogeneizados a cada 2 minutos. Foi adicionado volumes de 1-4 µL de reação de ligação ou do plasmídeo desejado e novamente incubado no gelo por 30 minutos. Após este tempo, procedeu-se um choque térmico nas bactérias, as quais do gelo passaram a banho-maria a 37°C por 20 segundos e posteriormente voltaram ao gelo por 2 minutos. A recuperação das células ocorreu adicionando-se 900 µL de meio SOC (meio SOB acrescido de 20 mM de glucose) e incubação em estufa a 37°C por 1 hora com

subsequente plaqueamento em meio LB sólido, contendo antibiótico apropriado, e incubação a 37°C por um período de 16-24 horas.

5.11. OBTENÇÃO DE DNA PLASMIDIAL

As colônias de bactérias crescidas em meio líquido, foram incubadas por 12 horas e em seguida direcionadas ao isolamento do DNA plasmidial segundo método de lise alcalina modificado (SAMBROOK et al., 1989), com exclusão da etapa de extração com fenol e clorofórmio. Quatro mililitros de cultura crescida foram centrifugadas a 21913 g durante 1 minuto, descartando-se o sobrenadante e suspendendo as células em 250 µL de solução P1 (Glicose 55 mM, Tris-HCl 25 mM e EDTA 10 mM). Em seguida foram adicionados 250 µL de solução P2 (SDS 1% e NaOH 0,2 M), homogeneizando-se gentilmente a amostra com posterior adição de solução P3 (60 ml de KOAc 5 M em 11,5 ml de ácido acético glacial e 28,5 ml de água), seguida de nova homogeneização e centrifugação a 21913 g por 25 minutos. O resíduo insolúvel foi descartado, enquanto os ácidos nucleicos presentes no sobrenadante foram precipitados com igual volume de isopropanol (~750µL), e levados à centrifugação a 21913 g por 20 minutos, descartando-se, em seguida o sobrenadante. Após ser lavado com etanol 70% (v/v) e seco, o sedimento foi dissolvido em TE (Tris-HCl 10 mM pH 8,0; EDTA 1 mM) contendo RNase a 10 µg/µL. A quantificação do DNA extraído das amostras foram feitas em espectrofotômetro NANODROP 2000 (Thermo Scientific) em comprimento de onda na faixa de 260 nm.

5.12. EXPRESSÃO DO scFv-10D8

As culturas de bactérias ArcticExpress, selecionadas de placas transformadas, foram cultivadas em 5 mL em meio LB com gentamicina 20 µg/mL durante a noite sob agitação de 160 RPM a 37°C. No dia seguinte, foram feitos repiques de 1:50 em 100 mL em meio LB sem antibiótico e incubado sob agitação de 160 RPM a 30°C por 3 horas. Após esse período, transferiu a cultura para temperatura de 13°C sob agitação de 160 RPM e nesse momento foi adicionado a cada cultura IPTG (1 mM final) e as culturas foram novamente incubadas em

agitador por 24 horas. Ao fim desse período e as células coletadas por centrifugação para extração dos conteúdos periplasmático e citoplasmático.

5.13. EXTRAÇÃO DO CONTEÚDO PERIPLASMÁTICO E CITOPASMÁTICO DE BACTÉRIAS QUE EXPRESSAM O scFv-10D8

Cada 100 mL de cultura de bactérias coletadas após a expressão foram ressuspensos em 1 mL de tampão TSE (TRIS-HCl 50 mM, pH 8; EDTA 40 mM, pH 8; sucrose 0.75 M) e incubados à 4°C por 10 minutos. Em seguida, para cada 100 mL de cultura inicial, foram adicionados 1,5 mL de tampão TSE diluído 1:4 causando choque osmótico nas células, e novamente incubado a 4°C por 30 minutos. As suspensões foram centrifugadas a 3220 g por 30 minutos e o sobrenadante referente ao periplasma recuperado e separado do sedimento. Os sedimentos foram suspensos em PBS no mesmo volume inicial de cultura e destinado a lise celular utilizando o sonicador (10 pulsos de 1 minuto com pausa de 30 segundos). As suspensões foram centrifugadas a 3220 g por 30 minutos e o sobrenadante referente ao citoplasma recuperado e separado do sedimento. Após a extração do conteúdo periplasmático, a amostra foi dialisada contra PBS 1X, para a retirada do excesso de sacarose do reagente usado para extração do periplasma, em membrana para diálise de 10 kDa de tamanho de poro sob agitação em câmara fria por 24 horas. Após esse período a amostra foi retirada da membrana de diálise e condicionada em balão volumétrico para seu congelamento instantâneo e seguir a realização da liofilização desse material por aproximadamente 48 horas. As amostras foram então dialisadas novamente após a liofilização da mesma forma descrita acima contra PBS 1X para que fosse equilibrado a concentração deste sal.

As amostras preparadas foram purificadas por cromatografia de afinidade contendo metal imobilizado utilizando a coluna His-Trap HP de 5 mL (GE *Healthcare*). As condições de uso consistiam em equilibrar a coluna com 5 volumes de coluna com tampão de equilíbrio (tampão fosfato e imidazol 10 mM em pH 7,4) para em seguida aplicar o extrato protéico induzido por IPTG. A amostra foi aplicada na coluna em fluxo de 1 mL/min para possibilitar a interação das proteínas expressas contendo cauda de histidina presentes no extrato total com os metais imobilizados da coluna. Cinco volumes de coluna de tampão de equilíbrio foram

utilizados para eluir a fração não ligante e a amostra de interesse, a matriz cromatográfica, foi eluída em tampão de equilíbrio em gradiente de 0-500 mM de imidazol. Após o procedimento de purificação foi utilizado filtros amicon de 10 kDa (Millipore) na amostra de interesse para retirar o excesso de imidazol. As amostras tanto da fração ligante como da fração não ligante foram coletadas para análise em gel de eletroforese em poliacrilamida a 12% e por *Western Blotting*.

5.14. VISUALIZAÇÃO DE PROTEÍNAS POR PESO MOLECULAR POR SDS-PAGE E COLORAÇÃO DE GEL

As amostras purificadas foram submetidas a dosagem por BSA (100 ng, 250 ng, 500 ng 750 ng e 1µg) contendo quantidade conhecida de proteínas foi adicionado a igual volume de tampão de amostra (glicerol 10%, DTT 5 mM, SDS 2,3%, Tris-HCl pH 6,8, 62,5 mM), fervidas por 5 minutos e aplicadas no gel. Os géis de 12% de poliacrilamida contendo SDS (SAMBROOK *et al.*, 1989) foram submetidos a uma corrente de 80 volts em sistema de eletroforese Mini-PROTEAN Tetra System (BIO-RAD). Os géis foram incubados em uma solução de Azul de Comassie 0,1% em solução de metanol 55% e ácido acético 22,5% por 3 h, seguido de descoramento em solução de metanol 30% e ácido acético 10%.

5.15. WESTERN BLOTTING DO PERFIL DE EXPRESSÃO E REATIVIDADE DO scFv-10D8 COM EXTRATOS PROTÉICOS TOTAIS DE PARASITOS

Após a eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS 12%, as amostras foram transferidas para membranas de PVDF (GE *Healthcare*), também por eletroforese a 10 Volts durante 40 minutos em tampão de transferência (Tris base 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20%), utilizando o aparelho de transferência semi-úmido. Após a transferência, a membrana foi corada com corante de Ponceau (Ponceau S 26 mM, ácido acético 5%) e depois bloqueada com PBS-T (Na_2HPO_4 25 mM; NaH_2PO_4 10 mM; Tween 20 0,3%) suplementado com 5% de leite em pó desnatado, sob leve agitação em temperatura ambiente, durante 1h. Feito o bloqueio, procedeu-se a três etapas de lavagem de 5 minutos cada com PBS-T.

Para analisar o perfil de reconhecimento do mAb-10D8, foram aplicados em cada canaleta os extratos proteicos totais de 2×10^6 parasitos de cultura da cepa G em fase logarítmica de crescimento (formas epimastigotas). A membrana foi incubada com o mAb-10D8, gentilmente cedido pela Dra. Nobuko Yoshida, na diluição 1:1000 por uma hora, seguida de 3 lavagens de 5 minutos com tampão PBS-T. Em seguida a membrana foi incubada com o anticorpo secundário anti-camundongo conjugado à *horseradish* peroxidase (HRP) na diluição 1:5000 por uma hora, seguido de 3 lavagens de 5 minutos com tampão PBS-T e duas lavagens de 5 minutos com tampão PBS.

Para a análise de expressão do scFv-10D8 em *E. coli* foram aplicados extratos proteicos totais de cultivos de *E. coli* expressando o scFv-10D8 ressuspensos em tampão de amostra de forma proporcional considerando-se a densidade óptica da cultura. A membrana foi incubada com o anticorpo primário anti-histidina (Bio-Rad) na diluição 1:3000 por uma hora, seguida de 3 lavagens de 5 minutos com tampão PBS-T. Em seguida a membrana foi incubada com o anticorpo secundário anti-camundongo conjugado à HRP na diluição 1:5000 por uma hora, seguido de 3 lavagens de 5 minutos com tampão PBS-T e duas lavagens de 5 minutos com tampão PBS.

Para testar a funcionalidade do scFv-10D8 expresso em *E. coli*, foram aplicados em cada canaleta os extratos proteicos totais de 2×10^6 parasitos da cepa G (formas epimastigotas). A membrana foi incubada com frações periplasmáticas e citoplasmáticas obtidas da expressão do scFv-10D8, seguido de 3 lavagens de 5 minutos com tampão PBS-T. Em seguida a membrana foi incubada com o anticorpo secundário anti-*His* (Bio-Rad) na diluição 1:3000 por uma hora, seguida de 3 lavagens de 5 minutos com tampão PBS-T. Em seguida a membrana foi incubada com o anticorpo anti-camundongo conjugado à HRP na diluição 1:5000 por uma hora, seguido de 3 lavagens de 5 minutos com tampão PBS-T e duas lavagens de 5 minutos com tampão PBS. A detecção do sinal foi feita com o kit *ECL Prime Western Blotting Detection Reagent* (GE Lifesciences).

5.16. ENSAIO DE INVASÃO DE CÉLULAS DE MAMÍFEROS (LLC-MK2) COM TRIPOMASTIGOTAS METACÍCLICOS PURIFICADOS DE CEPA G DE *T. cruzi*

Para realizar esse ensaio, formas epimastigotas de parasitos de cepa G foram expandidos em meio LIT a 28°C até atingirem a densidade de 1×10^7 parasitos/mL em 10 mL. Em seguida foram transferidos para um recipiente maior para que atingissem entre 5 a 7×10^7 em 100 mL. Após esse período os parasitos foram centrifugados a 5000 RPM por 5 minutos e retirado o sobrenadante e o sedimento ressuspendido em 2 mL de meio TAU (Triatomine Artificial Urine) por 2h a 28°C e em seguida adicionado 98 mL de meio TAU3AAG (meio TAU suplementado com 10 mM de glicose, 2 mM de ácido aspártico, 50 mM de ácido glutâmico e 10 mM de prolina) (Contreras *et al.*, 1988). As culturas foram mantidas por 7 dias a 28°C para que aproximadamente 80% dos parasitos se diferenciasssem em formas tripomastigotas metacíclicos. Após o tempo de diferenciação os parasitos foram purificados utilizando colunas de aproximadamente 4mL de DEAE-celulose e com lâ de vidro em sua base e os parasitos foram eluídos com PBSG 1X (glicose 2%) e colhidos frações de 1 mL. Essas frações foram analisadas quanto as formas do parasito e contadas.

Em paralelo, foram cultivadas células de mamíferos (LLC-MK2 – células de rim de macaco) em meio RPMI (Roswell Park Memorial Institute medium) (Gibco) suplementado com 10% de SFB (Cultilab) a 37°C com 5% de CO₂ até atingirem 80% de confluência e após, foram passadas para placas de 24 poços onde foram cultivadas 1×10^7 células por poço sob lamínulas de vidro circular de 13 mm (Knitel) e deixadas a 37°C com 5% de CO₂ até o uso.

Para o ensaio de ligação do anticorpo ao parasito foram utilizados 1×10^7 tripomastigotas metacíclicos purificados e incubados com diferentes quantidades do scFv-10D8 (250ng e 2500ng) em volume de final de incubação de 300µL por 2 horas em temperatura ambiente. Em seguida foram centrifugados a 3500 RPM por 5 minutos retirado o sobrenadante e o sedimento lavado uma vez com PBS 1X estéril para retirar os anticorpos que não ligaram, retirou-se o sobrenadante novamente e o sedimento foi ressuspendido em meio RPMI suplementado com 10% SFB.

Para o ensaio de infecção de células de mamíferos, a monocamada de células previamente cultivada em placa foi lavada uma vez com RPMI sem soro e adicionado os parasitos pré-tratados em contato com as células LLC-MK2 por 2 horas a 37°C com 5% de CO₂ para que ocorra a infecção. Ficando em uma razão de 100 parasitos para 1 célula.

Após o período de invasão, o meio de cultura foi removido e as células foram lavadas com PBS 1X estéril. As lamínulas contendo as células foram fixadas com solução de Bouin por 10 minutos, lavadas em seguida com água e adicionado etanol 70% por 10 minutos novamente seguido de lavagem com água e coradas por Giemsa 1:10 por 40 minutos. Em seguida, as lamínulas foram lavadas com água e passadas por um processo de desidratação com xilol (30%, 50% e 100%) e acetona (30%, 50% e 100%) e secadas a temperatura ambiente. As lamínulas foram montadas sob lâminas de vidro com Entelan. Esse experimento foi feito em triplicata.

Para análise do ensaio de invasão, as lâminas prontas foram levadas no scanner de lâminas (motorized Axio Imager Z2 microscope - Carl Zeiss, Jena, DE – equipado com automated scanning VSlide Metasystems, Altlussheim, DE) e a partir das imagens obtidas foi feita uma contagem a cega de pelo menos 300 células escolhidas randomicamente e o número de células infectadas foram determinadas e a porcentagem de células infectadas calculada.

5.17. CONSTRUÇÃO E EXPRESSÃO DO PLASMÍDEO pET32a-10D8

Esse vetor foi construído com o intuito de expressar o scFv-10D8 de forma citoplasmática e ficaria em fusão com a tag de tiorredoxina A, que ajuda no enovelamento da proteína favorecendo sua solubilidade. A construção foi feita digerindo o vetor e o inserto com as enzimas de restrição *Bgl*II e *Xho*I. A ligação foi feita no termociclador a 16°C overnight e o produto da ligação foi transformado na estirpe Rosetta de *E. coli* (FIGURA 6). Com as colônias obtidas foi feito o teste de indução da expressão do pET32a-scFv10D8 com 1% de glicose adicionado ao pré-inóculo e indução por 4 horas a 37°C com 0.8mM de IPTG.

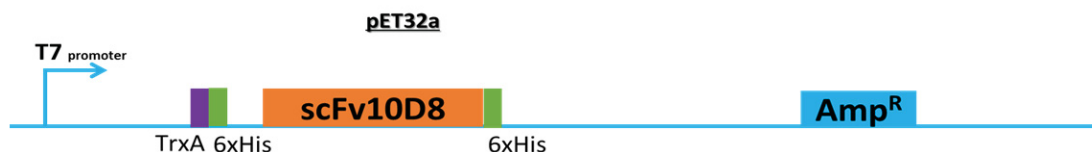


FIGURA 6: Modelo esquemático da construção do plasmídeo pET32::scFv10D8

FONTE: o autor (2018)

NOTA: Modelo da construção utilizada para gerar o plasmídeo de expressão citoplasmática pET32a-scFv10D8.

5.18. PRODUÇÃO DE scFv-10D8 NO FORMATO DE *intrabody*

Um scFv passa a ser um *intrabody* quando este é produzido pela célula que expressa o seu alvo, a fim de neutralizá-lo. Nesse sentido, um anticorpo pode ser expresso intracelularmente e/ou direcionado para um local específico, como compartimentos celulares, tais como: núcleo, retículo endoplasmático, membrana plasmática, mitocôndria, entre outros. A interação do *intrabody* com o alvo poderá resultar na modulação ou inibição das funções do antígeno. Desta forma, decidimos expressar o scFv-10D8 em formas epimastigotas de forma direcionada a via secretória, ou seja, a via seguida pelas proteínas de membrana assim como gp35/50. A construção foi feita digerindo o vetor de expressão em tripanosomatídeos pTREX Ama40::GFP_Neo através de restrição enzimática para retirar a sequência de Ama40, em seguida foi tratado com alcalino fosfatase para receber o peptídeo sinal (SP-BiP) previamente amplificado com primers específicos e o produto digerido com enzimas de restrição (SpeI e XbaI). Após a ligação e transformação, colônias foram analisadas para confirmação da estrutura esperada. A outra construção utilizando também restrição enzimática (XbaI e BglII) do produto de PCR do scFv10D8-6xHis foi feita para incorporação no vetor pTREX SPBiP::GFP_Neo. A ligação e transformação também foram feitas e confirmadas para a estrutura desenhada (FIGURA 7). Com as construções já prontas foram transfectadas no parasito da cepa G e selecionadas com antibiótico G418 (análogo a Neomicina). Foram feitas avaliações da presença da construção no parasito através de microscopia de fluorescência, citometria de fluxo, e por *western blotting*.

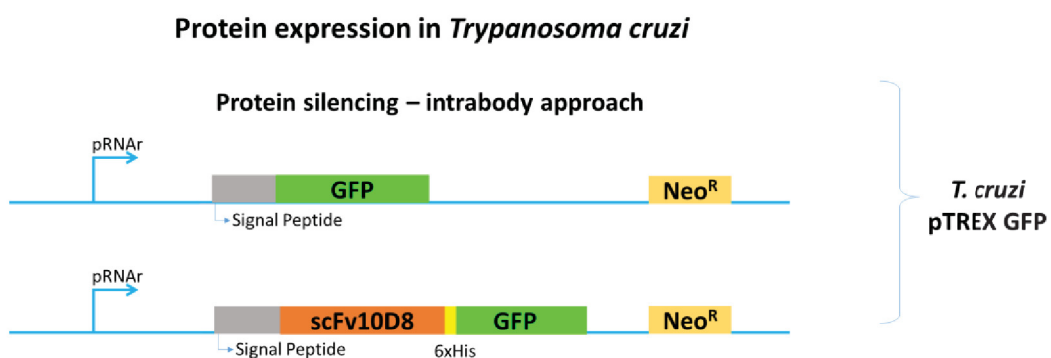


FIGURA 7: Construção e expressão do *intrabody*

FONTE: o autor (2018).

NOTA: Esquema da estratégia da clonagem do peptídeo sinal de grp78 (BiP) e scFv10D8 em pTREX::GFP_Neo.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir do hibridoma que expressa o anticorpo mAb-10D8 foi extraído RNA total e então obtido o cDNA que foi utilizado em diversas reações de PCR para amplificação das porções variáveis pesada e leve de IgG2b anti-gp35/50 do mAb-10D8, seguindo as condições de amplificação descritas por Fields *et al.*, (2013). Soares RJ (2014) confirmou por análise das amostras em gel de agarose o tamanho esperado para cadeia leve (350 pb) e para cadeia pesada (400 pb) confirmando que os tamanhos encontrados dos produtos de PCR são compatíveis com o esperado (FIELDS *et al.*, 2013). Também foi feita a clonagem (pGEM-T Easy) e a análise de uma possível cadeia variável kappa aberrante (cadeia afuncional que possui mutação que introduz um códon de parada prematuro) (DUAN E POMERANTZ, 1994) que não foi encontrada nos fragmentos amplificados do cDNA. Os dados do sequenciamento foram utilizados para a montagem do scFv-10D8 *in silico* e as cadeias variáveis foram organizadas na configuração V_h -linker- V_l , a qual é mais comumente utilizada. Esse formato de scFv foi submetido a síntese pela empresa GenScript que otimizou os códons para expressão em *E. coli* levando em consideração a tabela de códons usuais desta espécie (SOARES, RJ, 2014 – Dissertação de Mestrado).

6.1. ANÁLISE *IN SILICO* DO scFv-10D8: IDENTIFICAÇÃO DO POSSÍVEL SÍTIO DE ACOPLAMENTO DO ANTICORPO À gp35/50

A sequência deduzida de aminoácidos do scFv-1D8 reanalisada comparando-a e alinhado-a com sequências do banco de dados do IMGT e analisadas com a ferramenta Collier-de-Perles, que permite ao usuário analisar e obter a representação gráfica 2D de domínios variáveis de imunoglobulinas além da representação das cadeias pesada e leve do anticorpo (FIGURA 8). A sequência de aminoácidos do scFv-10D8 também foi analisada utilizando o Rosetta Web Server, dada uma sequência fasta simples da proteína, o programa realiza uma predição de estrutura baseada em homologia. Esses dados foram visualizados com o uso do PyMol Software, e a estrutura 3D adquirida é similar a outros scFvs descritos na literatura, é possível observar a formação do sítio de ligação ao antígeno formado

pelas porções CDRs (regiões determinantes de complementariedade) e pontes dissulfeto formada pelos resíduos de cisteína.

O resultado fornecido pelo IMGT/Collier-de-Perles mostra a construção de cada cadeia (VH-linker-VL) do anticorpo monomérico em uma representação gráfica 2D. Os aminoácidos nas posições de ancoragem são mostrados em quadrados, os círculos tracejados indicam lacunas para um melhor alinhamento e os círculos azuis indicam posições conservadas de aminoácidos. Em cada cadeia, o conjunto de cores mostrado indica as CDRs do anticorpo. Os dados observados com o uso desta ferramenta em conjunto com a estrutura tridimensional obtida são semelhantes aos outros scFvs descritos na literatura. É possível observar a formação do sítio de ligação ao antígeno pelas CDRs e as ligações dissulfeto de cisteína conservadas, que auxiliam no correto enovelamento e estabilização da estrutura, sugerindo que este anticorpo recombinante seja funcional.

A diferença estrutural entre a gp35/50 de *T. cruzi* grupo I e outros grupos é a presença de resíduos de galactofuranose na porção glicídica. Uma vez que ocorre reconhecimento diferencial pelo anticorpo monoclonal 10D8 das gp35/50 expressos por parasitos do grupo I em relação aos demais grupos, é provável que esses resíduos de galactofuranose participem do processo de interação entre anticorpo e antígeno (YOSHIDA, 2006). Segundo Acosta-Serrano *et al.* (1995), os resíduos de galactopirranose e de galactofuranose da mucina gp35/50 são ligados a resíduos de n-acetilglucosamina pelos carbonos 4 e 6 desta molécula, respectivamente. Testes iniciais de acoplamento *in silico* foram realizados entre o scFv-10D8 e alguns arranjos de porções glicídicas descritos em gp35/50 desses parasitos (ACOSTA-SERRANO *et al.*, 1995) (FIGURA 9A, B e C). A interação mais estável entre todas as moléculas testadas foi β -D-galactofuranose (1 \rightarrow 4) n-acetilglucosamina [Gal β (1 \rightarrow 4) Nac] para o local de ligação ao antígeno de scFv-10D8 (TABELA 4: Tabela). As interações entre os scFv-10D8 e os dados das moléculas glicídicas indicam que parece ter maior afinidade para os oligossacarídeos contendo resíduos de galactofuranose, o que é compatível com a composição de gp35/50 e com o epítipo de mAb-10D8 (DE LEDERKREMER AND COLLI, 1995; GOLGHER *et al.*, 1993; FONSECA *et al.*, 2016).

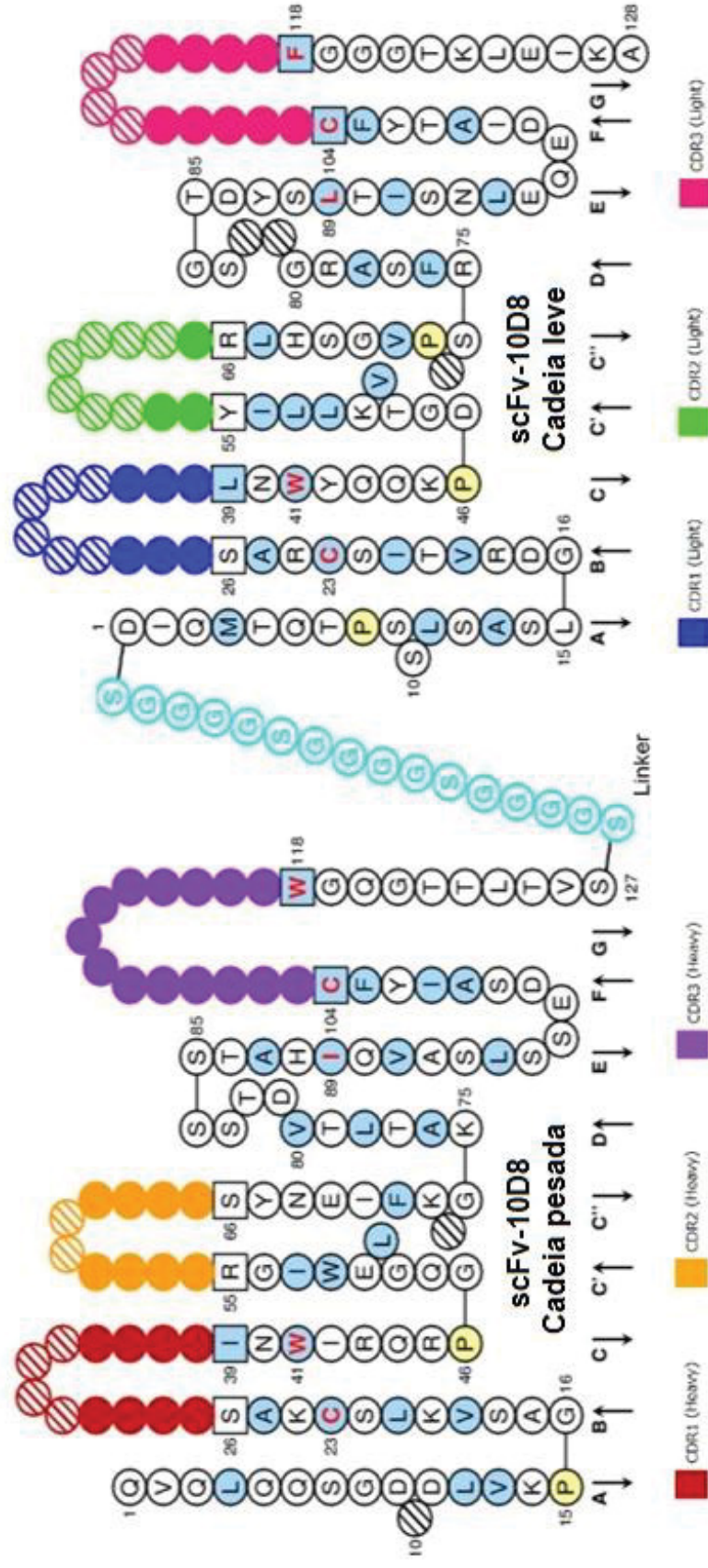


FIGURA 8: Representação bidimensional no formato colar de pérolas IMGT do gene do scFv-10D8

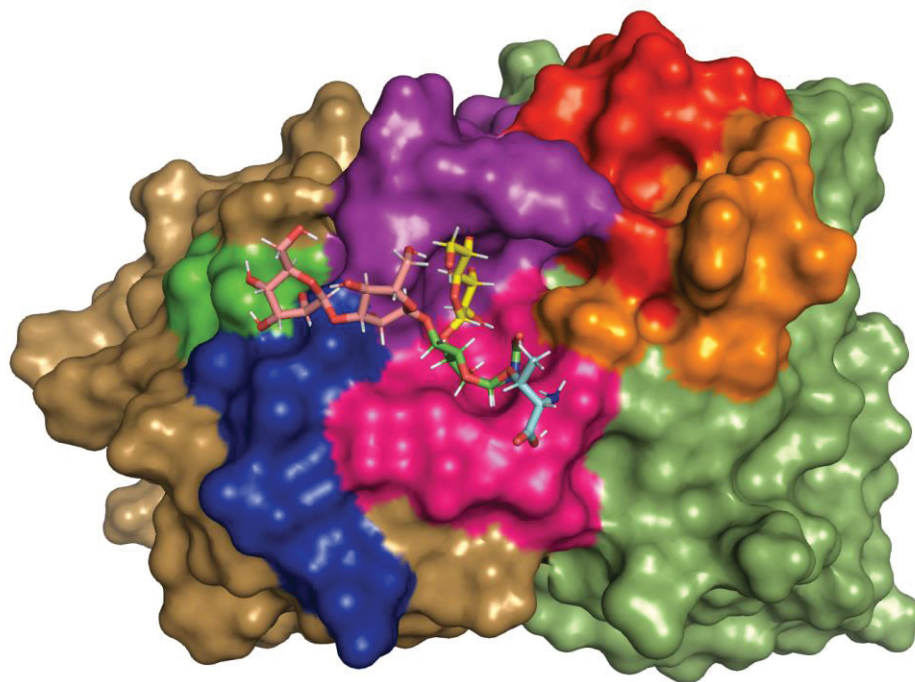
FONTE: SOARES RJ (2014).

NOTA: Resíduos de aminoácidos foram numerados de acordo com o padrão IMGT. Resíduos conservados na posição 23; 41; 89; 104 e 118 são conservados entre os domínios dos anticorpos. As esferas hachuradas são gaps que foram introduzidos para melhor alinhamento com as sequências de regiões variáveis depositadas. As sequências de aminoácidos de cores diferentes em cada porção representam as CDRs.

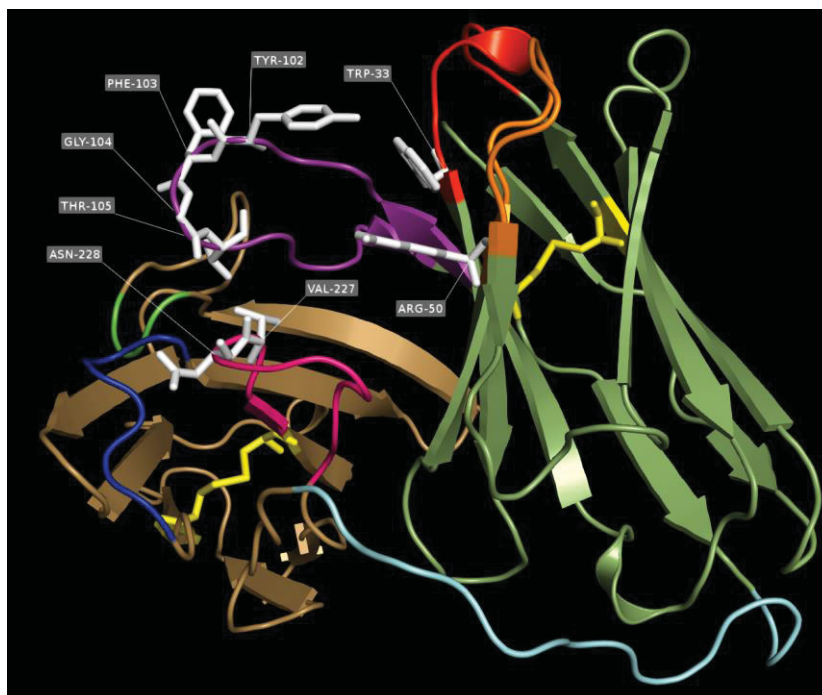
Como a análise *in silico* reforçou seu potencial para alvejar gp35/50, sugerindo que a montagem das cadeias variáveis como planejada no formato monomérico VH-linker-VL (onde o *linker* é um peptídeo flexível composto por serinas e glicinas) é funcional. Os resultados obtidos a partir do acoplamento *in silico* do anticorpo mostraram várias interações que foram previstas, no entanto, algumas estavam em regiões que seriam espacialmente inacessíveis ou inexistentes no anticorpo monoclonal, como era o caso do espaço entre o ligante e as cadeias pesadas e leves do scFv-10D8. Comparando as previsões de acoplamento com estudos similares, os resultados indicam boa estabilidade de ligação entre o scFv-10D8 e os ligantes testados (MATHEW e RAJ, 2009; PATEL *et al.*, 2012; KALADHAR *et al.*, 2011). A interação entre o sítio de ligação do scFv-10D8 ao antígeno β -D-galactofuranose (1 \rightarrow 4) n-acetilglucosamina [Gal β (1 \rightarrow 4) Nac] foi a mais estável entre todas as moléculas testadas (FIGURA 10). É importante notar que havia duas outras ligações mais estáveis para o Gal β (1 \rightarrow 4) Nac, no entanto, estas ocorreram no espaço entre o ligante e as cadeias pesadas do scFv-10D8. Se esta interação existir *in vivo*, pode ser devido a outros resíduos presentes na molécula nativa do anticorpo que foram aqui imitados pela sequência de aminoácidos de ligação. Os dados das interações entre scFv-10D8 e moléculas glicídicas indicam que o mAb-10D8 parece ter afinidade para oligossacarídeos contendo resíduos de galactofuranose e reforça os dados da literatura sobre a composição estrutural de gp35/50.

As estruturas apresentadas por Mendonça-Previato *et al.* (2013) mostra as diferentes montagens das estruturas glicídicas nas diferentes cepas. Observamos que, para a cepa G do *T. cruzi*, nem todos os ensaios de acoplamento dessas moléculas geraram resultados satisfatórios, pois estruturas com mais moléculas de galactopiranosose bloquearam o espaço físico para acessar a galactofuranose e isso diminuiu a energia de interação. Estes dados correspondentes às análises *in silico* precisam ser validados por experimentos de bancada utilizando moléculas sintéticas e anticorpos purificados. Cabe ressaltar que as mesmas análises utilizando um scFv não relacionado não apresentou capacidade de ligação.

A.



B.



C.

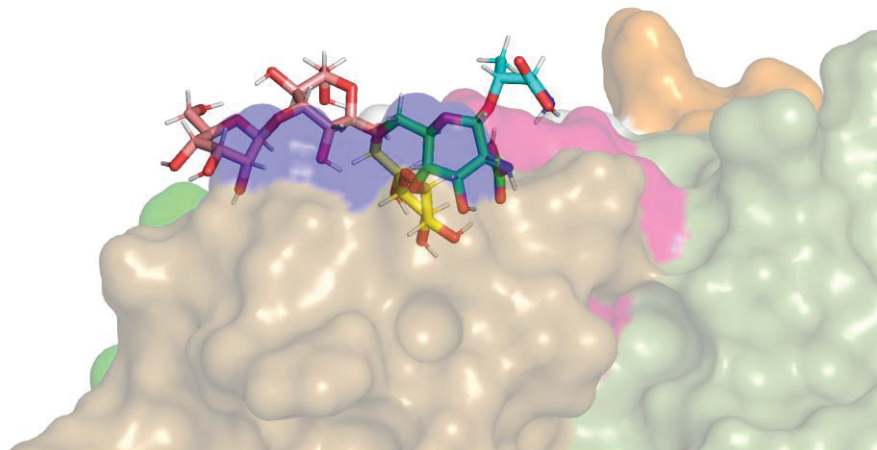
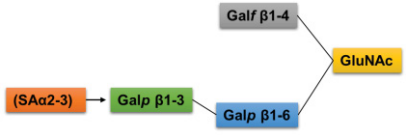


FIGURA 9: Estrutura 3D do scFv-10D8

FONTE: o autor (2018).

NOTA: **A.** mostra o local potencial de interação entre o scFv-10D8 e o seu ligante, a β -D-galactofuranose (1-4) n-acetilglucosamina. Modelo obtido *in silico* com a interação mais estável entre as duas moléculas usando o software Hex 8.0. A β -D-galactofuranose (1-4) n-acetilglucosamina é representada pelo modelo de esferas e bastões, enquanto scFv-10D8 é representado pelo modelo de superfície para melhor visualização do local de ligação ao antígeno. **B.** Representa o scFv-10D8 no formato VH-linker-VL destacando as hélices α e a folha β . Em amarelo são mostrados os resíduos de cisteína e as ligações dissulfeto que são críticas para a estrutura do anticorpo. Na figura **C** mostram o aminoácido treonina ligado à estrutura e também mostrando que este aminoácido é livre para possibilitar outras ligações do restante da molécula. Na estrutura da β -D-galactofuranose (1-4) n-acetilglucosamina, em rosa: N-acetilglucosamina, em amarelo: β -D-galactofuranose (1-4), em verde: β -D-galactopiranosose (1-6) em azul claro: resíduo do aminoácido treonina.

TABELA 4: Tabela de energias de acoplamento *in silico* entre moléculas de glicose e scFv-10D8

		Estrutura química + treonina			Substituir por Galp	Sem Galf (β1→4)
Docking	Energia	Energia	Galf (β1→4) Interação	Treonina livre	Energia	Energia
1º	-224.8	-234.7			-212.2	-216.4
2º	-223.0	-232.5			-203.6	-188.2
3º	-214.2	-220.4			-198.5	-180.5
4º	-207.4	-219.2			-194.9	-176.0
5º	-204.5	-210.5			-191.5	-172.2
6º	-200.9	-210.1			-189.0	-169.4

7°	-198.7	-210.0			-186.4	-166.4
8°	-198.4	-208.8			-184.1	-164.0
9°	-196.8	-208.1			-181.9	-161.6
10°	-194.9	-207.9			-180.1	-159.7
11°	-193.6	-206.9			-177.9	-157.8
12°	-193.6	-203.1			-175.9	-156.0
13°	-193.2	-203.1			-173.9	-154.5
14°	-193.0	-202.8			-172.3	-152.7
15°	-193.0	-202.8			-170.6	-151.3
16°	-192.3	-201.5			-169.0	-149.9
17°	-192.3	-201.3			-167.2	-148.5
18°	-192.1	-201.2			-165.7	-147.2
19°	-190.6	-200.3			-164.0	-145.9
20°	-188.2	-199.9			-162.4	-144.7

OBS: Coluna de docking: 1-20 Possibilidade de acoplamento *in silico* realizado pelo Hex Protein Docking 8.0. Coluna Substituída por Galp: Substituição de β -D-galactofuranose por β -D-galactopirranose. Coluna sem Galf: β -D-galactofuranose removida da estrutura. Galp: β -D-galactopirranose; Galf: β -D-galactofuranose; Nac: n-acetilglucosamina; ($\beta 1 \rightarrow 6$) - ligação $\beta 1-6$; ($\beta 1 \rightarrow 4$) - ligação $\beta 1-4$. Retângulos verdes correspondem aos dockings que melhor apresentaram energia de interação com a estrutura química avaliada e com treonina livre. As moléculas foram construídas de acordo com a representação esquemática de Acosta Serrano et al. (1995).

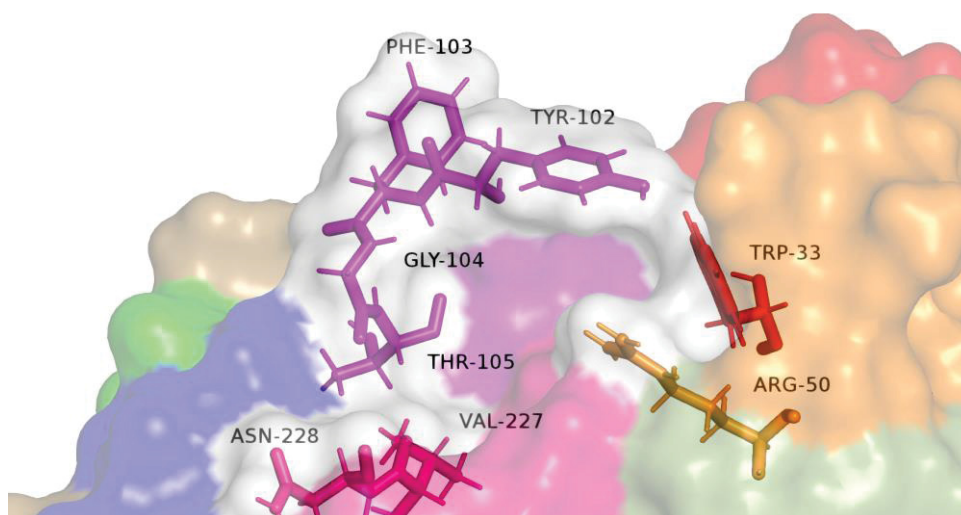


FIGURA 10: Predição de aminoácidos participantes do acoplamento

FONTE: o autor (2018).

NOTA: A figura mostra os aminoácidos potenciais que participam na interação entre o anticorpo e a porção glicídica das proteínas usando IntFOLD (Prediction of protein-ligand binding residues).

6.2. EXPRESSÃO DO scFv-10D8 RECOMBINANTE PARA AVALIAÇÃO DO RECONHECIMENTO

Para testar a funcionalidade de scFv-10D8, foi clonado no vetor de expressão pET22b com o objetivo de expressar a proteína de fusão no meio periplasmático para assegurar o dobramento adequado do scFv fusionado com a sequência sinal pelB na porção N terminal e com cauda de 6xHis na porção C terminal. Utilizando os clones obtidos e confirmados através de ArcticExpress foram feitos ensaios de indução da expressão pela adição do agente indutor IPTG utilizando o vetor pET22b-scFv-10D8. O produto expresso foi detectado pelo anticorpo anti-histidina e foi observado uma banda intensa compatível com o tamanho esperado em extratos totais (FIGURA 11A), porém a quantidade de proteína direcionada ao periplasma foi muito baixa em comparação às frações total e citoplasmática (FIGURA 11B).

As frações periplasmáticas e citoplasmáticas obtidas após a expressão de scFv-10D8 foram testadas quanto à capacidade de reconhecer glicoproteínas de superfície de *T. cruzi* em ensaios de *western blotting*. Utilizou-se um extrato proteico total de formas epimastigotas de cepa G. Como controle positivo utilizou-se o anticorpo monoclonal mAb-10D8 e como controles negativos utilizou-se o extrato de periplasma da expressão de um scFv não relacionado (gentilmente cedido pela Prof. Dra. Larissa A. Magalhães) e anticorpo monoclonal anti-6xHis sozinho. O scFv-10D8 extraído do periplasma mostrou comportamento semelhante ao do anticorpo monoclonal 10D8, mas o extrato citoplasmático apresentou maior quantidade de proteína (FIGURA 11C). Controles negativos não mostraram reatividade às proteínas do *T. cruzi*.

A expressão scFv foi realizada no vetor pET22b+ que permite a inserção da sequência líder pelB para endereçar produtos de expressão ao periplasma, que é um ambiente propício para a formação das pontes dissulfeto permitindo a conformação correta da proteína incluindo scFvs. (OSSYSEK *et al.*, 2015). Os níveis de expressão de scFv-10D8 encontrados no periplasma são consistentes com os resultados relatados para outros scFvs (AYUB *et al.*, 2012; YUSAKUL *et al.*, 2017; LIM *et al.*, 2004; RIPPMAN *et al.*, 1991). Mesmo com este baixo nível de expressão no periplasma, conseguimos mostrar sua capacidade de ligação através do ensaio

de *western blotting*, confirmando a mesma especificidade descrita para o mAb-10D8 (YOSHIDA *et al.*, 1997).

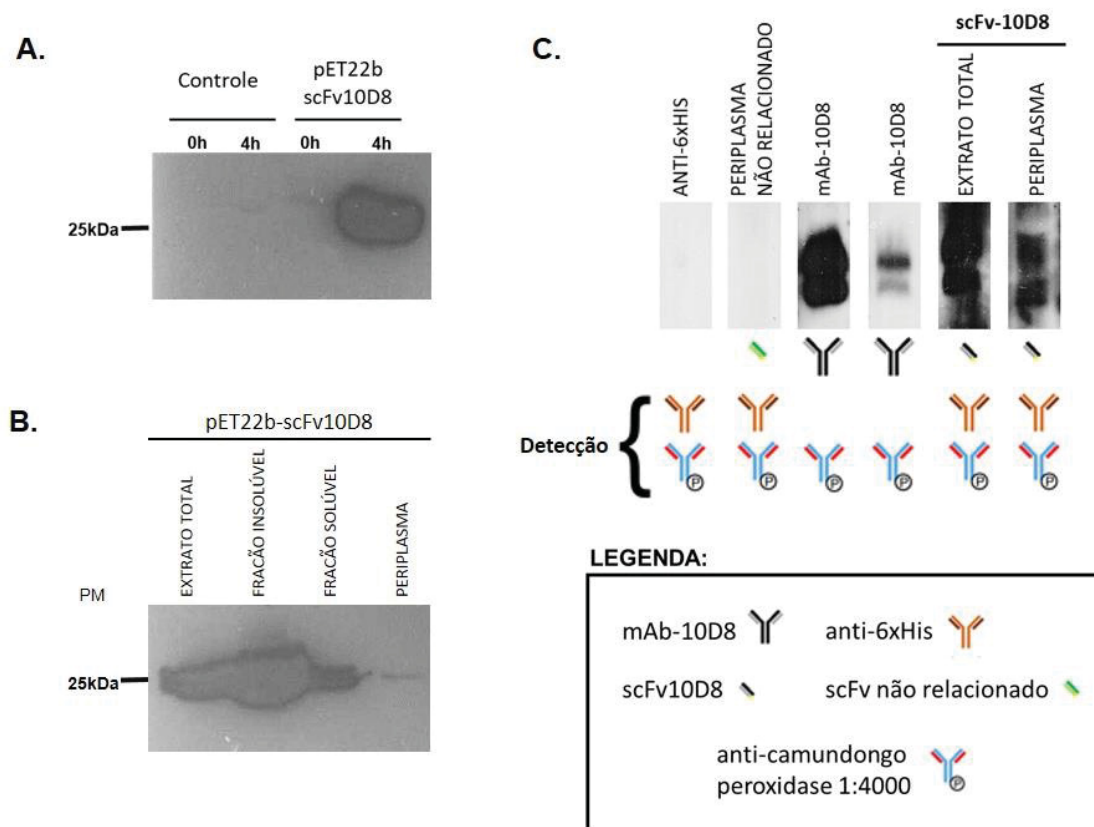


FIGURA 11: Expressão, solubilidade e reatividade do scFv-10D8

FONTE: o autor (2018).

NOTA: **A.** *Western blotting* dos extratos obtidos de não induzido (0h) e induzido (4h) de culturas de *E. coli* cepa Rosetta com e sem pET22b-scFv-10D8. **B.** Células bacterianas foram separadas na fração periplasmática, proteínas solúveis citoplasmáticas e não solúveis e foram testadas para o reconhecimento do scFv-10D8 por *western blotting* usando anticorpo anti-6xHis para a detecção. **C.** Imunoblot de extrato de formas epimastigotas marcadas com scFvs e mAbs como anticorpo primário e seus controles. O esquema abaixo da figura mostra a sequência de incubação de anticorpos usados para detectar sua reatividade. Anti-6xHis e scFv não relacionado foram usados como controles negativos e o mAb-10D8 como controle positivo.

6.3. ENSAIO DE INVASÃO EM CÉLULAS DE MAMÍFERO

Para testar se o scFv-10D8 tem efeito de bloqueio ou atenuação na invasão do *T. cruzi*, os tripomastigotas metacíclicos (que também expressam gp35/50) foram purificados e pré-tratados com a fração periplasmática contendo scFv-10D8 em

diferentes diluições e incubados com células de mamíferos. O resultado encontrado após contagem diferencial de células infectadas mostrou uma inibição específica da invasão em comparação com scFv e mAb não relacionados em diferentes diluições, que mostraram uma taxa elevada de infecção de células de mamífero (aprox. 35%). Por outro lado, o mAb-10D8 apresentou uma taxa de infecção reduzida quando comparado aos controles negativos (~10%) em ambas as diluições. A fração periplasmática com scFv-10D8 mostrou uma redução na taxa de infecção à medida que a diluição diminuía, ou seja, um comportamento dependente da dose (FIGURA 12A). Na análise estatística, observamos que, para o scFv não relacionado, todas as diluições (1: 2, 1: 5, 1:10 e 1:20) apresentaram diferença estatística entre as diluições de scFv-10D8 1: 2, 1: 5 e 1:10 (barra horizontal 1) (FIGURA 12A).

Para melhorar a caracterização funcional do scFv-10D8 foi realizado o ensaio de invasão celular de parasitas pré-tratados. ScFv-10D8 mostrou uma capacidade clara para reduzir especificamente a invasão de parasitas, o que é compatível com os resultados descritos por AYUB *et al.*, 2012. Neste ponto, a eficiência do scFv para bloquear a invasão não pode ser comparada com o mAb-10D8, já que precisamos melhorar o protocolo de purificação do scFv-10D8 e uma vez que o scFv é uma molécula monovalente e o mAb é divalente. Apesar de não ser capaz de comparar mAb-10D8 e scFv, podemos inferir que o anticorpo recombinante mantém a capacidade do mAb-10D8 de bloquear a infecção, mesmo sendo uma molécula monovalente.

No teste de invasão do *T. cruzi* utilizando scFv-10D8 purificado em diferentes concentrações (1 ng/ μ L e 10 ng/ μ L), para ambas as frações da proteína incubada com células de mamíferos observou-se que a infecção também foi atenuada após a contagem das células infectadas. Neste ensaio, vemos que a taxa de infecção entre as concentrações de scFv-10D8 diminuiu aproximadamente 12% e 7%, respectivamente para as frações em comparação com scFv não relacionado nas mesmas concentrações e parasitas selvagens (ambos aproximadamente 35%). Na análise estatística deste ensaio observou-se que não houve diferença estatística entre as diferentes concentrações das frações scFv-10D8 testadas. Para as duas concentrações de scFv não relacionado, a análise mostrou diferença entre as concentrações de ambas as frações de scFv-10D8 (FIGURA 12B).

No ensaio funcional utilizando o scFv-10D8 purificado utilizamos duas concentrações da proteína (1 ng/μL e 10 ng/μL) em ambas as concentrações, observamos que a proteína apresentou capacidade de reduzir a invasão parasitária em células de mamíferos quando comparada ao controle (sem a presença do anticorpo). Este resultado foi semelhante ao encontrado no experimento sem a proteína purificada.

Os resultados apresentados por scFv-10D8 nos mostram seu potencial para serem utilizados no controle da doença de Chagas em estratégias como a paratransgênese, na qual bactérias da flora do inseto são utilizadas para inserir o anticorpo através de modificações genéticas para que o efeito da molécula possa comprometer a capacidade de transmitir a forma infectante no inseto vetor (HURWITZ *et al.*, 2011). Esta estratégia já foi utilizada em alguns estudos, como a doença de Chagas, Leishmaniose e Malária, pois esta última doença mostrou-se eficiente demonstrando insetos transgênicos capazes de diminuir a quantidade de formas infectantes (ISAACS *et al.*, 2012).

Os resultados obtidos com o scFv-10D8 utilizando o extrato bruto nos mostra a capacidade de diminuir a infecção mesmo sendo uma fração que não passou por processo de purificação, isso demonstra que essa amostra poderia ser utilizada para a paratransgênese como já mostrado para o simbiote *R. rhodnii* em *R. prolixus* (DURVASULA *et al.*, 1999). Foi visto também a introdução de *E. coli* expressando dsRNA com sucesso para uma proteína de ligação heme e catalase no intestino de *R. prolixus* e que gerou consequências físicas para o vetor induzindo RNAi sistêmico (TARACENA *et al.*, 2015). A paratransgênese também tem sido utilizada em moscas tsé-tse para manipular *Sodalis glossinidius* para liberar nanobodies anti-tripanosoma no intestino do hospedeiro (DE VOOGHT *et al.* 2014). Uma questão levantada no uso da paratransgênese é em relação a entrega de simbiotes geneticamente modificados ao inseto no campo. Porém já existe trabalhos tentando contornar esse problema mostrando o uso de sistema de entrega direcionada para bactérias manipuladas usando microencapsulação para controlar a disseminação utilizando o inseto *Homalodisca vitripennis* em casos da doença de Pierce em condições de campo simulado (ARORA *et al.*, 2015). Os dados demonstrados pelo scFv-10D8 também são semelhantes aos *nanobodies* em *T. brucei*. Este formato tem sido

utilizado para proteínas de superfície de *Trypanosoma brucei* e tem mostrado capacidade lítica nestes parasitas, reduzindo sua população *in vitro* e *in vivo* (STIJLEMANS *et al.*, 2011). Embora ofereça vantagens como tamanho reduzido em relação ao scFv facilitando sua difusão nos tecidos, o *nanobody* que são anticorpos naturais presentes nos camélídeos, apresenta maior dificuldade na humanização. Sendo mais provável o desenvolvimento de um anticorpo quimérico e com isso perdendo sua vantagem de ser de tamanho reduzido. Por outro lado o scFv recombinante, que é sintetizado a partir de um anticorpo monoclonal de origem murina, facilita este processo de humanização pois nesse tipo de anticorpo existe a possibilidade de substituição de sequências murinas por sequências homólogas humanas, sendo mais difundido e gerando uma menor probabilidade de resposta imunogênica e sendo o formato mais recomendado para uso em terapias humanas.

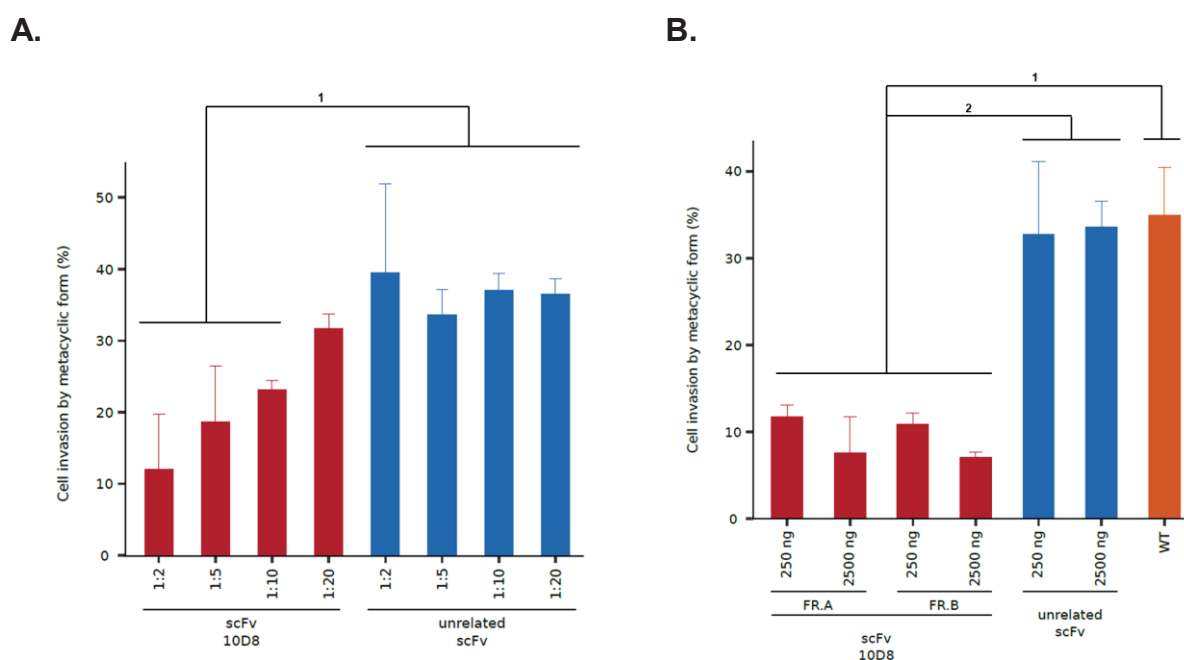


FIGURA 12: Efeito da pré-incubação de tripomastigotas metacíclicos (MT) com scFv-10D8 na invasão de células LLC-MK2.

FONTE: o autor (2018).

NOTA: **A.** MTs da cepa G de *T. cruzi* foram pré-incubados com diferentes diluições de frações periplasmáticas contendo scFv-10D8, ou scFv não relacionado, por 2 horas. **B.** MTs da cepa G do *T. cruzi* foram pré-incubadas com diferentes concentrações (250 ng e 2500 ng) para ambas as frações de proteína purificada (scFv-10D8) e scFv não relacionado por 2 horas e controle negativo (sem presença de anticorpo). As diferenças estatísticas são representadas por letras acima da barra do gráfico. Os parasitas foram lavados e incubados com células LLC-MK2 a MOI 100:1. A percentagem de células infectadas foi determinada pela média de contagens a cega de 300 células de três

experimentos independentes. As principais diferenças estatisticamente significativas são indicadas pelas barras horizontais acima das colunas ($p \leq 0,05$).

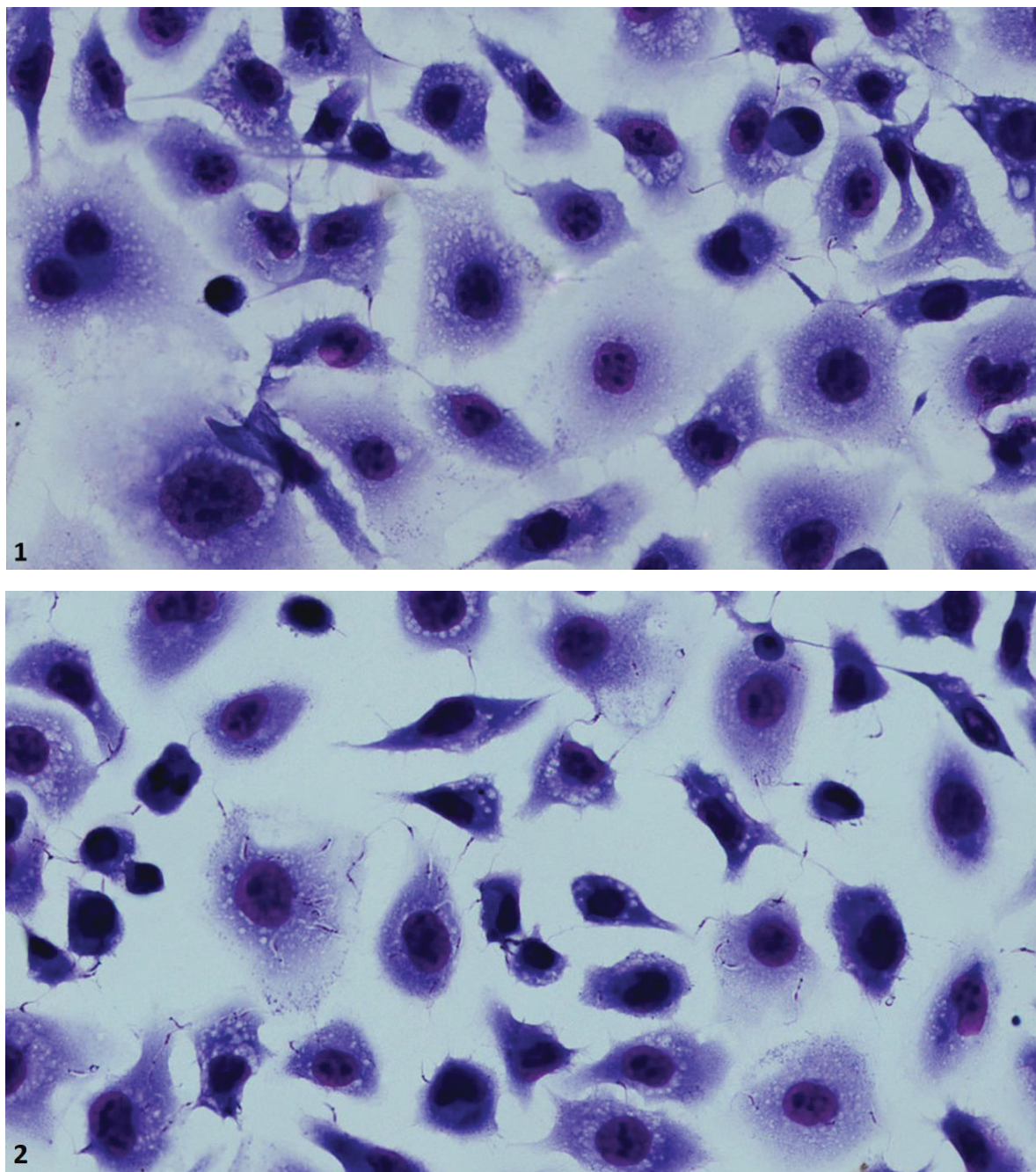


FIGURA 13: Imagens obtidas de ensaios de invasão células LLC-MK2 por formas metacíclicas pré-incubadas, ou não com scFv-10D8.

FONTE: o autor (2018).

NOTA: Imagens digitalizadas em um scanner de slides (microscópio motorizado Axio Imager Z2 - Carl Zeiss, Jena, DE - equipado com varredura automatizada VSlide Metasystems, Altlußheim, DE) do experimento de invasão de células de mamíferos realizada com a proteína purificada. 1.

Experimento de invasão com a presença de scFv-10D8. 2. Experimento de invasão com a presença de scFv não relacionado.

6.4. TENTATIVAS DE OTIMIZAÇÃO DA EXPRESSÃO DO scFv-10D8

Devido à dificuldade encontrada para expressar o scFv10D8 no periplasma da bactéria buscou-se estratégias para melhorar sua expressão, e uma das alternativas foi utilizando o vetor de expressão citoplasmático pET32a. A construção foi feita e com as colônias obtidas realizou o teste de indução da expressão do pET32a-scFv10D8 com 0,8 mM de IPTG. Os resultados observados foi o perfil de banda de expressão do scFv10D8 no tamanho esperado de aprox. 46 kDa e o teste de solubilidade nos mostrou que uma parcela da proteína está solúvel (FIGURA 14A e B). Com esses resultados foi feito um teste preliminar de purificação da proteína e as primeiras tentativas de purificação não funcionaram sendo necessário a otimização. Esses resultados são os primeiros esforços em relação a essa construção e mostra bastante promissor para conseguir a proteína purificada e posteriormente testar em ensaios de invasão.

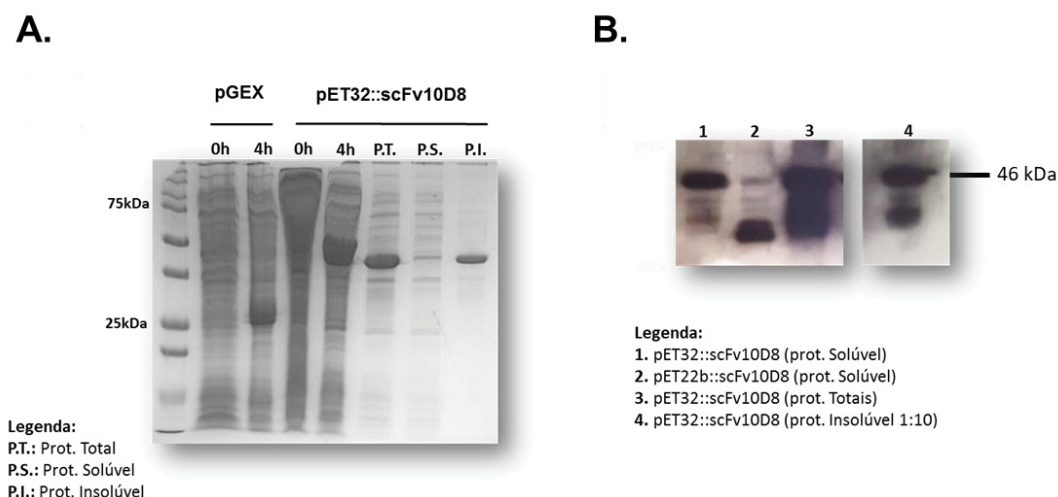


FIGURA 14: Expressão e solubilidade do pET32-scFv-10D8

FONTE: o autor (2018).

NOTA: Em **A.** Gel de Poliacrilamida 12% corado por Coomassie da indução do pET32-scFv10D8 e teste de solubilidade. pGEX 0h (não induzido) e 4h usados como controle. P.T.: proteína total, P.S.: Proteína solúvel, P.I.: Proteína insolúvel. **B.** *Western Blotting* do teste de solubilidade de pET32-scFv10D8 usando anti-6xHis para detecção das frações. 1. Proteína solúvel de pET32-scFv-10D8. 2.

Proteína solúvel de pET22b-scFv-10D8 usado como comparativo. 3. Proteína total de pET32-scFv-10D8. 4. Proteína insolúvel de pET32-scFv-10D8.

Para esses primeiros esforços em relação a formas alternativas de expressão do scFv10D8 foi utilizado a SHuffle® T7 Express - New England Bio Labs (BESSETTE *et al.*, 1999). Uma célula derivada da estirpe B de *E. coli* modificada para minimizar os problemas de formação de pontes dissulfeto e o mau dobramento das proteínas. As redutases no citoplasma de *E. coli* mantém cisteínas na sua forma reduzida, reduzindo assim qualquer ponte dissulfeto que possa formar neste compartimento. Essa célula SHuffle® tem deleções dos genes de redutase glutarredoxina e tioredoxina redutase que permite a formação de pontes dissulfeto no citoplasma. Esta combinação de mutações é normalmente letal, mas a letalidade é suprimida por uma mutação na enzima peroxiredoxina (New England Bio Labs). Está linhagem parece promissora por já ter sido utilizada até para expressão de anticorpos inteiros, mas cabe ressaltar que neste caso a expressão do scFv-10D8 foi citoplasmática, porém os testes piloto com essas estirpes não apresentaram diferença significativa da expressão do anticorpo de interesse.

Outra alternativa buscada para melhorar a expressão do scFv10D8 foi por meio vetores de expressão em levedura (*P. pastoris*) que na literatura mostra ser um sistema otimizado de expressão em relação a bactéria *E. coli* e concentração elevada de proteína recombinante. Para isso foi utilizado o vetor pGAPZ α B que possui peptídeo sinal para secretar a proteína de fusão e o pGAPZ B que é de expressão citoplasmática, a construção de ambos plasmídeos foram utilizando digestões enzimáticas dos vetores e do inserto e transformados em células bacterianas estirpe DH10B (FIGURA 15). As colônias obtidas das duas construções foram testadas para confirmar a presença do inserto e o DNA plasmidial foi extraído e digerido com AvrII para linearização do plasmídeo para que possa ser inserido na célula de levedura (FIGURA 16). Após esse processo, fizemos a transformação por eletroporação em células competentes de levedura (*P. pastoris*) e os testes não mostraram expressão detectável do scFv-10D8. Nesse cenário, optou-se por continuar utilizando o sistema de expressão em bactérias.

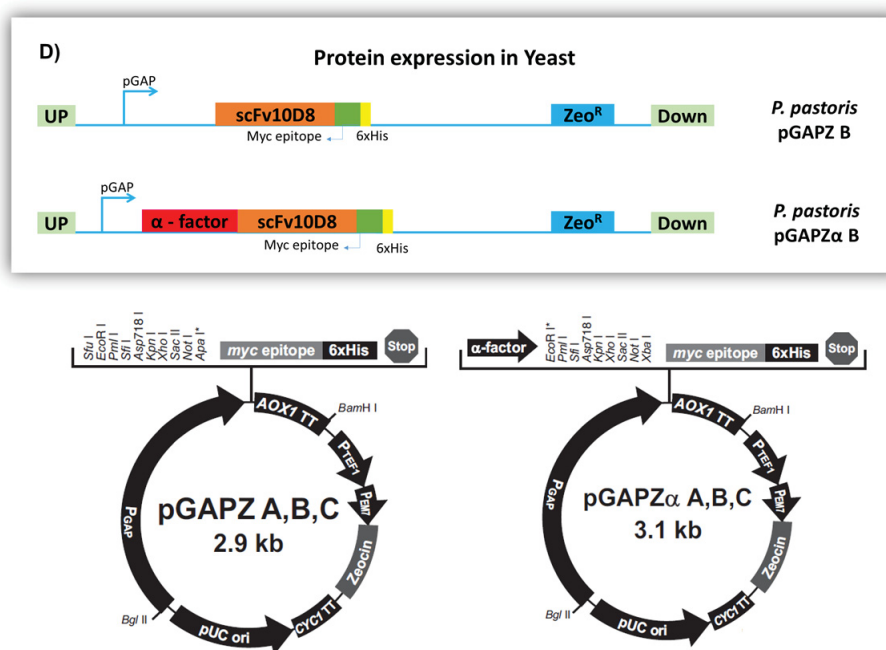


FIGURA 15: Modelo esquemático da construção dos plasmídeos

FONTE: o autor (2018).

NOTA: Modelo da construção do plasmídeo pGAPZB-scFv-10D8 e pGAPZαB-scFv-10D8.

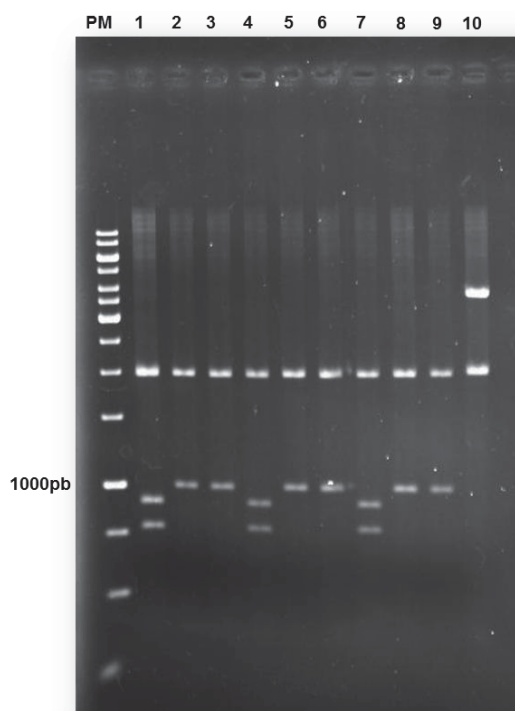


FIGURA 16: Perfil de restrição enzimática de clones da construção do plasmídeo

FONTE: o autor (2018).

NOTA: Perfil de restrição em gel de agarose 1% da digestão de clones selecionados digeridos com *Bam*HI e *Bgl*II (1-10). PM – Peso molecular 1kb.

6.5. BLOQUEIO DA INVASÃO PELA EXPRESSÃO *INTRABODY* scFv-10D8

O scFv-10D8 no formato *intrabody* expresso em formas epimastigotas foi construído para ser direcionado para a via secretória, ou seja, a via utilizada pelas proteínas de membrana assim como a gp35/50. A construção foi feita utilizando um vetor de tripanosomatídeos (pTREX Ama40::GFP_Neo) com enzimas apropriadas e tratado com alcalino fosfatase para receber o peptídeo sinal (grp78/BiP - uma chaperona residente que regula o dobramento de proteínas e impedindo a agregação) previamente amplificado com primers específicos e o produto digerido com enzimas de restrição. Após a confirmação da estrutura esperada outra construção foi realizada para incorporação do produto de PCR do scFv-10D8-6xHis para adicionar ao vetor já construído (pTREX SP-BiP::GFP_Neo). Essas construções prontas foram transfectadas e parasitos selvagens ou carregando as construções pTREX SP-BiP::GFP_Neo e pTREX-BiP-scFv-10D8-6xHis::GFP_Neo foram analisados por microscopia de fluorescência e citometria de fluxo para detecção das proteínas de fusão. Nos dados de microscopia foram observadas sinais muito fracos de fluorescência de GFP, mesmo após a seleção de parasitos G418 resistentes (FIGURA 17) e na citometria de fluxo não foram observados detectados sinais de fluorescência (dados não mostrados). Na expectativa de que uma provável expressão SP--scFv-10D8::GFP poderia estar reduzindo os níveis de expressão do alvo (gp35/50) foram realizadas análises de *Western blotting* dos extratos dos parasitos transfectados. Utilizando o anticorpo anti-GFP observamos um baixo nível de expressão nos parasitos transfectados com o SP--GFP, e níveis não detectáveis de SP--scFv10D8::GFP, que está de acordo com os dados de citometria de fluxo e microscopia de fluorescência. Com o anticorpo anti-GP35/50 não detectamos mudanças no nível de expressão entre as amostras (FIGURA 18). Estes resultados podem ser explicados pela baixíssima expressão do scFv-10D8::GFP. Contudo cabe ressaltar que mesmo que tivéssemos altos níveis de expressão do scFv não necessariamente haveria mudança nos níveis de expressão

da proteína. Isso também foi mostrado em alguns trabalhos (BEERLI *et al.*, 1996; HARWERTH *et al.*, 1993), que demonstraram que alta afinidade não é suficiente para *intrabody* ser funcional.

Com os resultados apresentados concluímos que os níveis de expressão do scFv10D8 são muito baixos, impossibilitando a redução da expressão da proteína alvo. Diferentemente do obtido aqui, Ayub *et al.* (2012) mostraram resultados satisfatórios com uso de *intrabody* contra a proteína ribossômica TcP2 β (scFv C5) que pode ser detectado 24h após a indução e os parasitas induzidos mostraram uma redução na taxa de crescimento, sugerindo bloqueio da atividade de tradução ribossômica (AYUB *et al.*, 2012). Nesse sistema é possível que a expressão regulada tenha sido crucial para garantir expressão do *intrabody*.

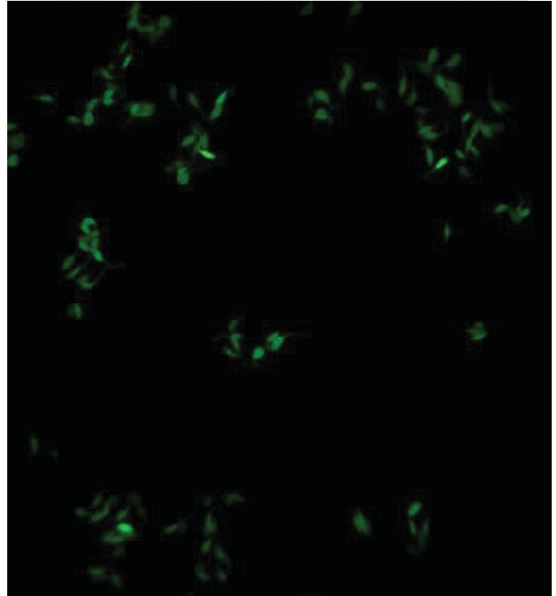
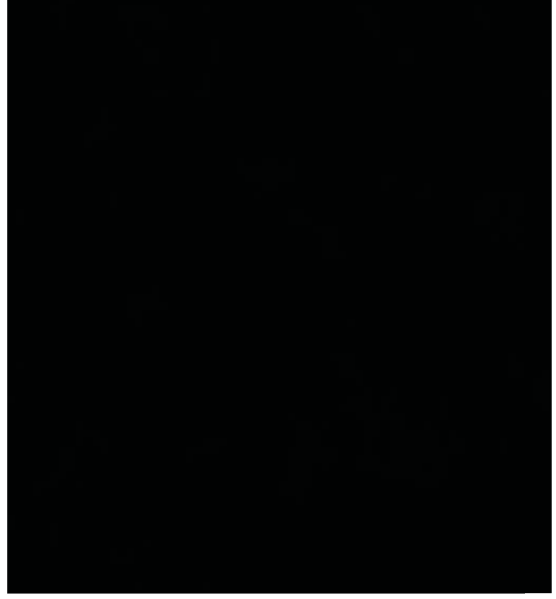
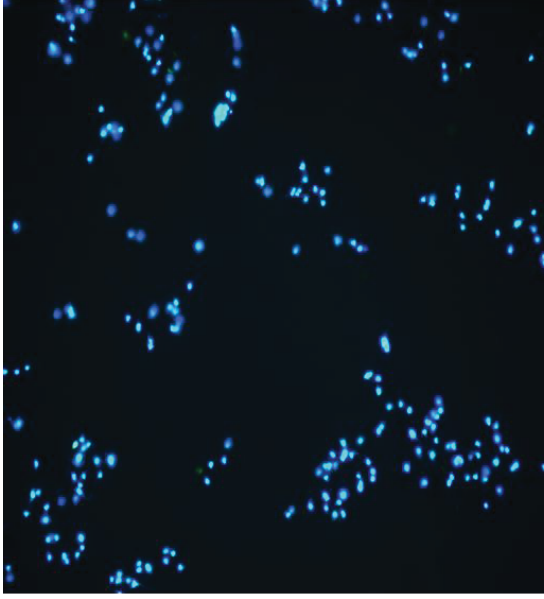
A utilização de *intrabodies* para outras doenças foram promissores como o uso para β -amilóide que demonstrou inibição do acúmulo dessa proteína em um modelo de camundongo com doença de Alzheimer (SUDOL *et al.*, 2009). Foi utilizado também essa metodologia em plantas para interferir com as funções celulares e interações da célula de planta com seu patógeno (GAHRTZ *et al.*, 2009). Outra aplicação do *intrabody* foi em camundongo transgênico que constitutivamente expressa esse formato de anticorpo para α -VCAM1 resultando no fenótipo esperado (distribuição aberrante de células B imaturas no sangue e medula óssea) (MARSCHALL *et al.*, 2014).

Ayub e colaboradores (2012) verificaram ser difícil estabelecer uma relação entre o nível de expressão do *intrabody* e o efeito funcional pois acreditam que o mecanismo seja que o *intrabody* precise ser traduzido antes de ligar na proteína alvo e assim inibir a síntese de proteínas. Isso significa que a inibição total é difícil de se obter pois a síntese do *intrabody* também vai ser bloqueada. Os resultados observados foram os primeiros esforços de expressão de *intrabody* em tripanosomatídeos em que foi visto capacidade de inibir a síntese protéica *in vitro* com resultados semelhantes para *T. brucei* e *T. cruzi* (AYUB *et al.*, 2012).

Questões relativas as propriedades intrínsecas desse tipo de abordagem e os princípios que determinam o fracasso ou o sucesso dessa tecnologia ainda não foram abordados de forma satisfatória até o momento (MARSCHALL *et al.*, 2015). Porém alguns pontos podem ser levantados, como por exemplo na análise de três

diferentes anticorpos expressos para a mesma célula e analisados quanto a sua afinidade, níveis de expressão e capacidade de se ligar a um epítipo linear ou conformacional, observaram que o *intrabody* com menor afinidade mas com alto nível de expressão foi mais eficiente em silenciar o alvo (MARSCHALL *et al.*, 2015). Foi visto também que o anticorpo com maior eficiência também reconheceu epítipo linear e isso pode concluir que interfere com o processo de dobramento da proteína e pode acelerar a degradação do alvo (ZHANG *et al.*, 2012).

Com os resultados obtidos até o momento, mais testes devem ser conduzidos e melhorados (p.ex. otimização de códons) para esse tipo de abordagem, pois esse formato pode ser ferramenta útil para atenuação do parasito. Como visto anteriormente por Junqueira *et al.* (2011) o clone avirulento CL-14, derivado da cepa CL de *T. cruzi*, pode ser modificado para expressão de antígeno tumoral (NY-ESO) e ser usado em protocolos de vacinação ou tratamento anti-cancer em modelo murino. A atenuação utilizando *intrabodies* anti-proteínas de superfície pode ser uma estratégia eficiente/mais segura para garantir avirulência de parasitos utilizados nesse processo idealizado por Junqueira *et al.* (2011).



GFP

pTREX-SP-BIP::GFP_Neo

pTREX-SP-BIP-scFv10D8-6HIS::GFP_Neo

FIGURA 17: Microscopia de Fluorescência dos parasitos de cepa G de *T. cruzi* expressando os plasmídeos transfectados

FONTE: o autor (2018).

NOTA: As amostras foram fixadas com paraformaldeído 2% e o núcleo corado com DAPI. GFP – expressão apenas do gene repórter, pTREX-SP-BiP::GFP_Neo – expressão do peptídeo sinal fusionado a GFP, pTREX-SP-BiP-scFv10D8-6xHis::GFP_Neo

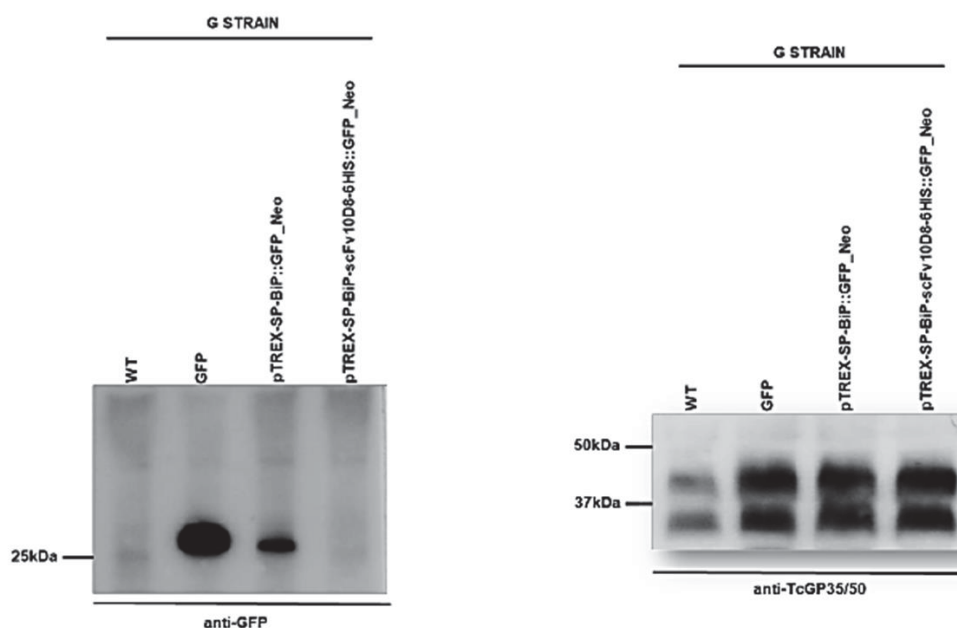


FIGURA 18: Expressão do *intrabody*

FONTE: o autor (2018).

NOTA: Perfil de reatividade por *Western blotting* dos extratos de parasitos transfectados de cepa G de *T. cruzi* utilizando o anticorpo para identificação do nível de GFP (anti-GFP) e para a identificação do nível de GP35/50 (anti-TcGP35/50). GFP – expressão apenas do gene repórter, pTREX-SP-BiP::GFP_Neo – expressão do peptídeo sinal de BiP fusionado a GFP, pTREX-SP-BiP-scFv10D8-6xHis::GFP_Neo – expressão do scFv10D8 fusionado ao peptídeo sinal de BiP e GFP.

6.6. OBTENÇÃO DOS FRAGMENTOS DAS REGIÕES VARIÁVEIS DE OUTROS ANTICORPOS MONOCLONAIS

Uma vez que, de forma geral, o mAb-10D8 reconhece preferencialmente gp35/50 de cepas do grupo Tcruzil, decidimos construir outros scFvs, como para a proteína multigênica MASP também presente na superfície do parasito através da imunização em camundongos da proteína purificada, porém em testes preliminares utilizando alguns membros dessa proteína não foi obtido sucesso necessitando de

mais estudos. Foram construídos também a partir do mAb-2B10 também reconhece gp35/50 de forma mais ampla. Além de mAb2B10, também foi processado o hibridoma de mAb-3F6 que reconhece gp82. Ambos os mAbs reconhecem proteínas são codificadas por famílias multigênicas (DI NOIA *et al.*, 1998).

Já o mAb 3F6 reconhece a proteína gp82 é uma glicoproteína ancorada à membrana celular por GPI presente somente na forma tripomastigota metacíclico, uma vez que anticorpos contra essa proteína não foram capazes de reconhecê-la quando testados contra as outras formas evolutivas do parasito (ARAYA *et al.*, 1994). Como já descrito, a gp82 é uma molécula de adesão e dispara a via de sinalização de cálcio nas células do hospedeiro. A gp82 atua como receptor de sinalização que medeia a fosforilação proteica em resíduos de tirosina, o que é necessário para a invasão celular (FAVORETO *et al.*, 1998).

A partir do cDNA obtido desses anticorpos monoclonais, foram realizadas várias reações de PCR para amplificar as porções variáveis pesada e leve do mAb-2B10 e mAb-3F6 seguindo as condições de amplificação descritas por Fields *et al.* (2013) e seguidas pelo nosso grupo para sequenciamento do mAb-10D8. O resultado obtido da corrida do gel de agarose, mostra tamanhos esperados para a cadeia pesada (aprox. 400 pb) e para a cadeia leve (aprox. 350 pb) (FIGURA 19), que são compatíveis com os resultados de Fields *et al.* (2013). Além disso, também foram feitas predições das sequências deduzidas de aminoácidos de ambos mAbs e comparados com sequência do Banco de Dados do IMGT utilizando a ferramenta Collier-de-Perles para visualização gráfica dos domínios variáveis (FIGURA 20). As posições ocupadas por cada aminoácido correspondem as mesmas utilizadas para o scFv-10D8. A representação bidimensional das cadeias pesada e leve foram desenhadas e montadas com o peptídeo flexível (linker – SGGGG_{3x}). Foram feitas também predições da estrutura tridimensional dos scFvs e análise de acoplamento *in silico* de moléculas glicídicas utilizando os ligantes Gal_p: β-D-galactopiranosose; Gal_f: β-D-galactofuranose; Nac: n-acetilglucosamina; (β 1→6) – ligação β 1-6; (β 1→4) – ligação β 1-4 (FIGURA 21). Já foi visto que gp35/50 é ancorado por GPI e rica em treonina. Os glicanos são ligados a resíduos de treonina no centro da proteína através de N-acetilglucosamina e dependendo do isolado de *T. cruzi* pode conter galactofuranose ou galactopiranosose (PREVIATO *et al.* 1994, ACOSTA-

SERRANO *et al.*, 1995, SALTO *et al.*, 2000). Yoshida e colaboradores (1989) mostrou que o mAb-10D8 que reconhece gp35/50 reage com epitopos contendo galactofuranose e o mAb-2B10 parece reagir com epitopos contendo galactopirranose. Os resultados de *docking* para o scFv-10D8 e scFv-2B10 corroboram com os dados de Yoshida e colaboradores. Os resultados obtidos do *docking* do scFv-3F6 pode ser utilizado como um controle negativo, pois seu alvo não é uma porção glicídica mas sim um peptídeo. Estudos mostrando a identidade de sequências de aminoácidos de gp82 deduzidas de cDNA de formas metacíclicas mostraram que em relação a sua funcionalidade não há diferença para a cepa G e cepa CL em relação ao domínio central de ligação de células de mamífero (RUIZ *et al.*, 1998). Manque e colaboradores (2000) usando peptídeos sintéticos de gp82 verificaram que o sítio de ligação celular está em contato e sobrepõe parcialmente o epítipo de mAb-3F6 e pode ser conformacional sendo formado pela justaposição de duas sequências separadas na molécula linear por um alongamento hidrofóbico. Yoshida (2006) verificou que dentro das sequências que possui o sítio de ligação e o epítipo para mAb-3F6 existem diferenças entre as moléculas de formas metacíclicas para formas tripomastigotas derivadas de cultura (TCT) como substituições de aminoácidos não carregados ou positivamente carregados.

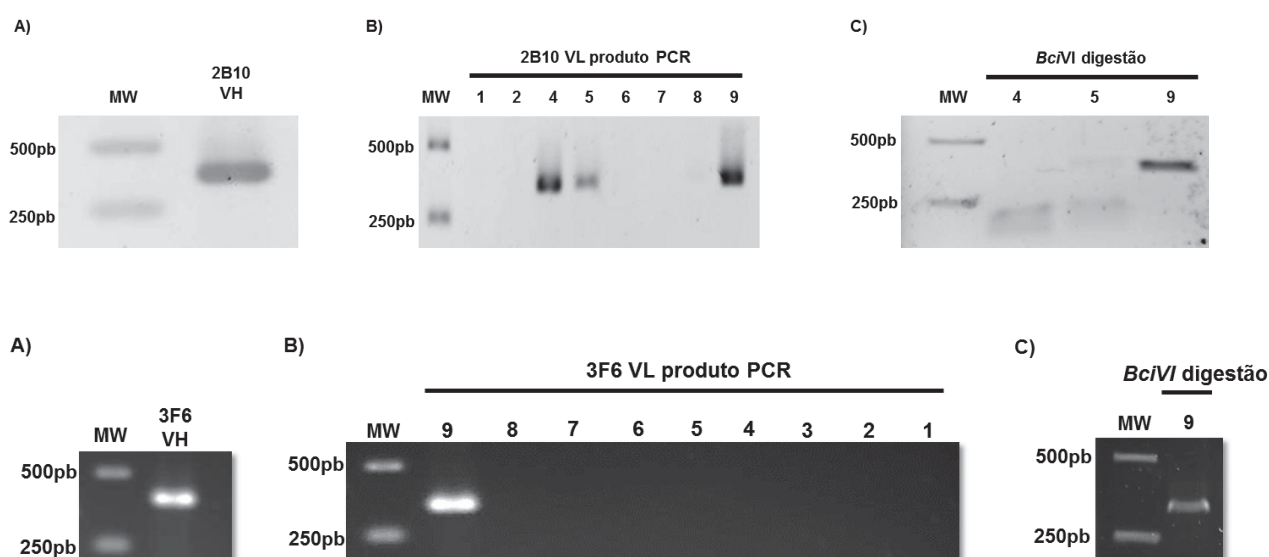


FIGURA 19: Amplificação de porções variáveis pesada e leve de outros anticorpos monoclonais

FONTE: o autor (2018).

NOTA: Amplificação de regiões variáveis pesada e leve de mAb-2B10 e -3F6 a partir do cDNA. **A e B:** Os produtos de PCR dos fragmentos das cadeias variáveis pesada (~ 400 pb) e leve (~ 350 pb), respectivamente. **C:** Detecção de amplificação de cadeia aberrante por digestão do amplicon de VL com enzima *Bcl*VI.

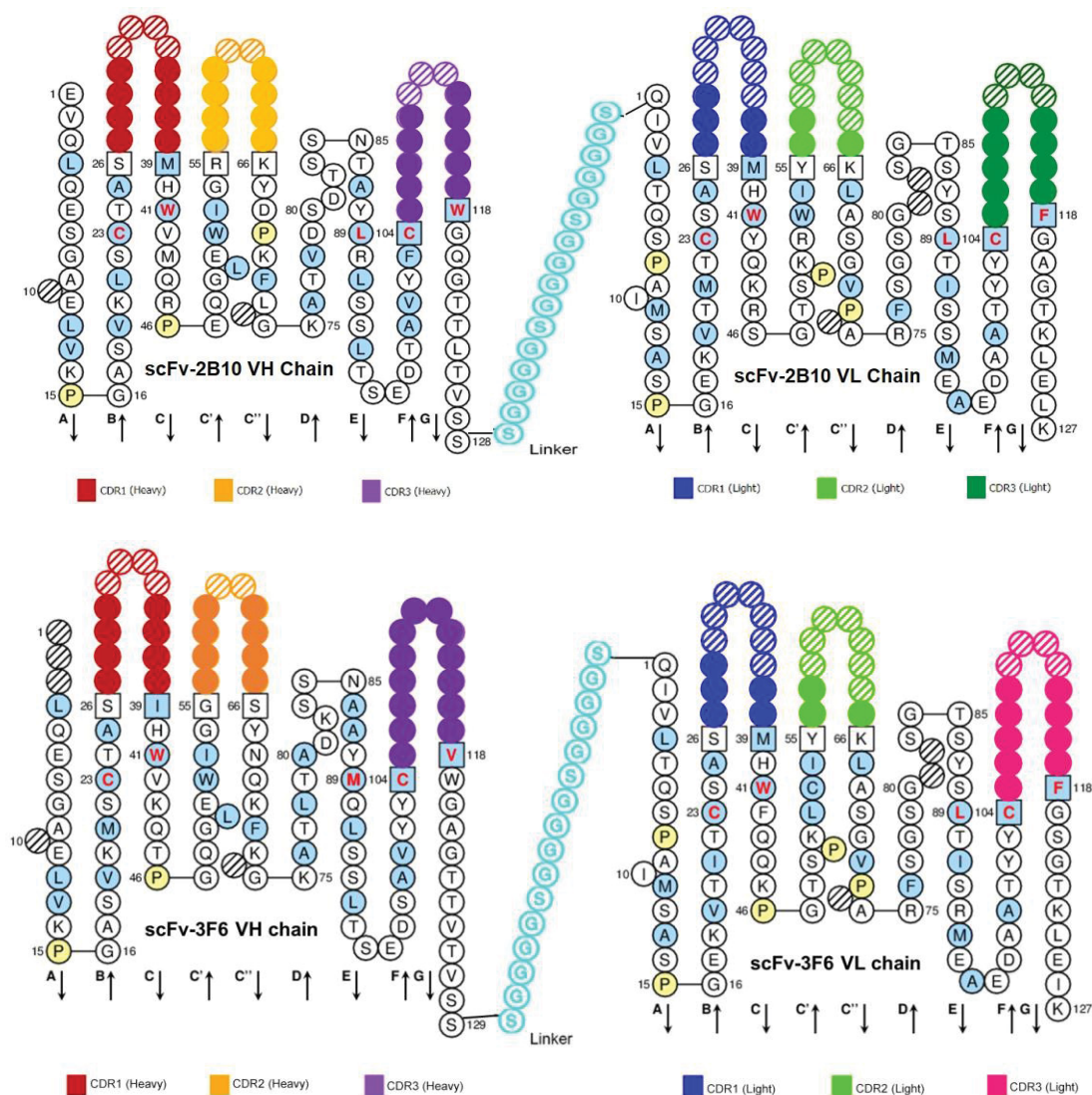
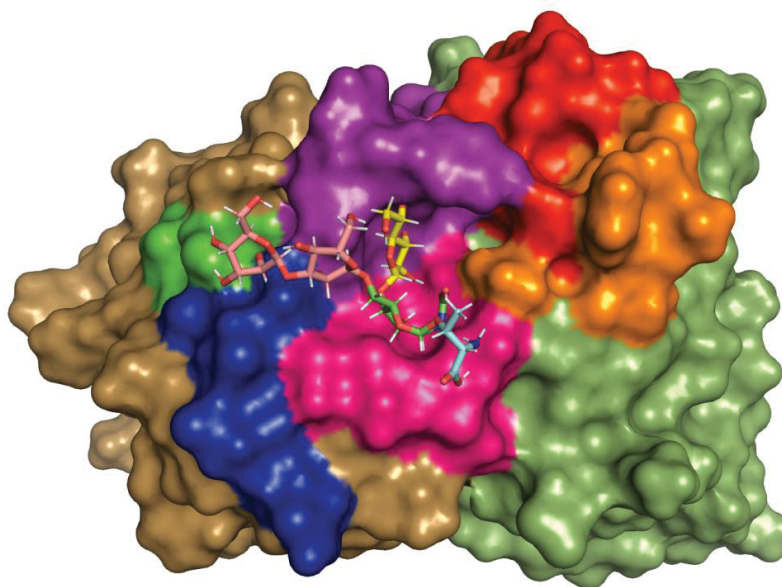


FIGURA 20: Representação bidimensional no formato colar de pérolas IMGT do gene do scFv-2B10 e scFv-3F6.

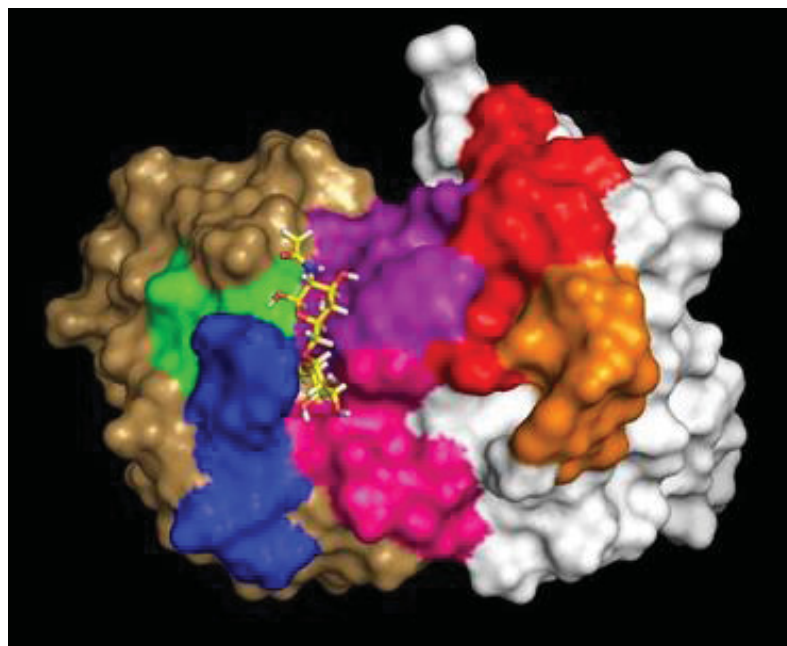
FONTE: o autor 2018.

NOTA: Resíduos de aminoácidos foram numerados de acordo com o padrão IMGT. Resíduos conservados na posição 23; 41; 89; 104 e 118 são conservados entre os domínios dos anticorpos. As esferas hachuradas são gaps que foram introduzidos para melhor alinhamento com as sequências de regiões variáveis depositadas. As sequências de aminoácidos de cores diferentes em cada porção representam as CDRs

A.



B.



C.

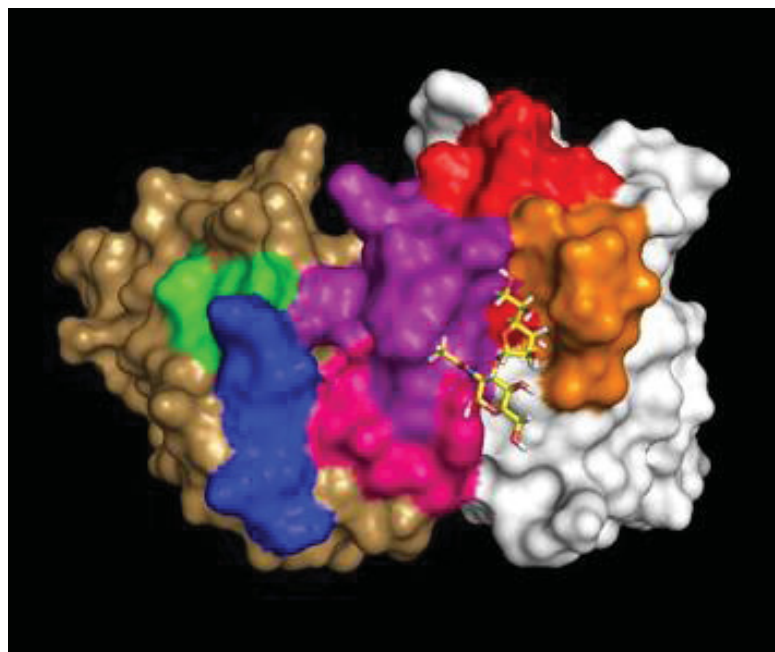


FIGURA 21: Predição da estrutura tridimensional comparativa do scFv-10D8,-2B10 e -3F6

FONTE: o autor (2018).

NOTA: **A)** Sítios prováveis de interação entre scFv-10D8 e β -D-galactofuranose (1-4) N-acetilglucosamina que é a parte conhecida do epítopo reconhecido pelo mAb 10D8. **B)** scFv 2B10 e interação com β -D-galactopiranosose (1-6) N-acetilglucosamina. **C)** Sítio de interação do scFv-3F6 com β -D-galactofuranose (1-3) N-acetilglucosamina. Modelo obtido *in silico* com a ligação mais estável entre as duas moléculas usando o software Hex 8.0. A molécula glicídica está representada pelo modelo de esferas e varetas, enquanto os scFvs está representado pelo modelo de superfície para melhor visualização do sítio de ligação ao antígeno. As predições foram realizadas utilizando os mesmos softwares citados para realizar a análise do scFv-10D8.

Como característica comum, os membros da família gp82 reconhecido pelo mAb-3F6 estão presentes em cepas testadas como G, CL, Tulahuen, Y entre outras, tanto de grupo I como grupo II do *T. cruzi*. Essas proteínas fazem parte do repertório de moléculas da superfície de formas tripomastigotas metacíclicas, assim como a gp35/50 reconhecida pelo mAb-2B10 que também é expressa em ambos grupos do parasito. Diferente do mAb-10D8 que reconhece a proteína gp35/50 expresso por cepas do grupo I apenas.

As formas metacíclicas de diferentes cepas utilizam mecanismos diferentes para invadir a célula hospedeira. Formas infectivas de cepa G utilizam preferencialmente gp35/50 para a interação com a célula (YOSHIDA *et al.*, 1989, 1997). Nessa cepa, a via de sinalização que envolve adenilato ciclase gerando AMP

cíclico e liberação de cálcio é ativada nos parasitos (NEIRA *et al.*, 2002). Contudo para outras cepas como por exemplo a CL, a invasão é mediada por gp82 (RAMIREZ *et al.*, 1993). Nesta cepa a via de sinalização ativada envolve a fosfolipase C e liberação de cálcio (YOSHIDA *et al.*, 2000). Os estudos a respeito desses anticorpos monoclonais mostram que essas proteínas estão envolvidas na adesão do parasito a célula hospedeira e que mAbs contra essas proteínas de superfície inibem a invasão no hospedeiro mamífero e poderiam gerar scFv, um vez que essa proteína está presente em grupos diferentes do *T. cruzi*.

Com a determinação da sequência desses novos scFvs, ampliou-se as possibilidades de uso, tanto na forma simples quanto combinada, permitindo ampliar o espectro de cepas e formas atingidas.

7. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Neste trabalho foi possível realizar ensaios com anticorpo de cadeia única anti-gp35/50 de *T. cruzi* após algumas mudanças nas condições de expressão. O anticorpo de interesse mostrou funcionalidade *in vitro* semelhante ao encontrado pelo anticorpo monoclonal de origem mAb-10D8 em ensaios de *Western blotting*. Foi observado também que com as análises *in silico* foi possível obter informações sobre o sítio de interação dos anticorpos e prever quais resíduos de aminoácidos participam da interação antígeno::anticorpo. Em novos estudos poderá ser refinado as análises de *docking* para guiar na criação de mutações sítios-dirigidas para alterar o reconhecimento de gp35/50 (por exemplo: reconhecer um maior repertório de gp35/50).

Os níveis de expressão do scFv-10D8 encontrados no trabalho foi semelhante aos descritos na literatura. Outros sistemas de expressão alternativos foram testados para tentar aumentar a eficiência de expressão (sistema de expressão em levedura e sistema de expressão citoplasmática em células SHuffle®), porém os sistemas utilizados não implementaram a expressão, observando um resultado semelhante ou menor ao já utilizado. Para esses dados devem ser conduzidos novos ensaios e outros sistemas podem ser incluídos para a melhoria da expressão.

A caracterização funcional *in vivo* do scFv-10D8 pelo ensaio de bloqueio de invasão de células de mamíferos nos revelou que o anticorpo recombinante tem capacidade de diminuir a invasão de parasitos na monocamada de células. Estes dados mostram a aplicabilidade do scFv no desenvolvimento de novas estratégias.

Outra possibilidade é usar esse anticorpo para testar em infecção por formas metacíclicas em camundongos para avaliar a redução da parasitemia, semelhante ao ensaio já realizado com o mAb-10D8.

Com o resultado observado *in vitro* do scFv-10D8, este será aplicado em experimentos de modificação da bactéria presente na flora do inseto vetor (paratransgênese) para observar se há redução de formas infectivas presente em seus dejetos, ou na redução de sua virulência.

O desenvolvimento de novos scFvs (mAb-2B10 – anti-gp35/50; e mAb-3F6 – anti-gp82) já se iniciou e serão expressos e purificados para serem explorados em

ensaios de infecção de forma individual ou em combinação com scFv-10D8. Essas abordagens poderão potencializar os efeitos do scFv-10D8.

Por fim, sabe-se que scFv-10D8 reconhece formas epimastigotas e tripomastigota metacíclicas e poderá ainda ser conjugado com peptídeos ligantes a fim de serem usados em estratégias para a paratransgênese ou ainda no desenvolvimento de *diabody* (anticorpos recombinantes diméricos composto da associação de dois fragmentos de anticorpos de cadeia única (scFv) que se ligam ao antígeno de maneira bivalente) aumentando a capacidade de ligação ao alvo para que assim possa interferir na transmissão vetorial da doença de Chagas.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACOSTA-SERRANO A, ALMEIDA IC, FREITAS-JUNIOR LH, YOSHIDA N, SCHENKMAN S. The mucin-like glycoprotein super-family of *Trypanosoma cruzi*: structure and biological roles. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 114, 2, 143-150, 2001.
- ACOSTA-SERRANO A, SCHENKMAN S, YOSHIDA N, MEHLERT A, RICHARDSON JM, FERGUSON MAJ. The lipid structure of the glycosylphosphatidylinositol-anchored mucin-like sialic acid acceptors of *Trypanosoma cruzi* changes during parasite differentiation from epimastigotes to infective metacyclic trypomastigote forms. *J Biol Chem* 270: 27244-27253, 1995.
- ADAMS GP, SCHIER R, MARSHALL K, WOLF EJ, MCCALL AM, MARKS JD, WEINER LM. Increased affinity leads to improved selective tumor delivery of single-chain Fv antibodies. *Cancer Res*. 58(3):485-90, 1998.
- AHMAD ZA, YEAP SK, ALI AM, HO WY, ALITHEEN NBM, HAMID M. scFv antibody: principles and clinical application. *Clin Dev Immunol*. Article ID 980250, 2012.
- ALIBERTI JCS, CARDOSO MAAG, MARTINS GA, GAZZINELLI RT, VIEIRA LQ, SILVA JS. Interleukin-12 mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice and is produced by murine macrophages in response to live trypomastigotes. *Infection and Immunity*. 64, 1961-1967, 1996.
- ALMEIDA EA, RAMOS ANJ, CORREIA D, SHIKANAI-YASUDA MA. Brazilian Network of Attention and Studies on *Trypanosoma cruzi*/HIV Co-infection and others immunosuppression conditions. *Ver Soc Bras Med Trop*. 42(5):605-608, 2009.
- ALSFORD S, KELLY JM, BAKER N, HORN D. Genetic dissection of drug resistance in trypanosomes. *Parasitology*, 1-14, 2013.
- ANDRADE AL, ZICKER F, OLIVEIRA RM, SILVA AS, LUQUETTI A, TRAVASSOS LR, et al. Randomised Trial of efficacy of benznidazole in treatment of early *Trypanosoma cruzi* infection. *Lancet*. 348:1407-1013, 1996.
- ANDRADE SG, MAGALHÃES JB, PONTES AL. Evaluation of chemotherapy with benznidazole and nifurtimox in mice infected with *Trypanosoma cruzi* strains of different types. *Bull World Health*. 63,721-726, 1985.
- ANDRADE SG, RASSI A, MAGALHÃES JB, FERRIOLLI EF, LUQUETTI AO. Specific chemotherapy of Chagas disease: a comparison between the response in patients and experimental animals inoculated with the same strains. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop*. 30:1, 27-35, 1992.
- ANDREWS, N., W.; ABRAMS, C.,K.; SLATIN, S., L.; GRIFFITHS, G., A *T. cruzi*-secreted protein immunologically related to the complement component C9: evidence for membrane pore-forming activity at low pH, *Cell*, 61, 7, 1277-1287, 1990.
- ANONYMOUS 1999. Recommendations from a Satellite Meeting. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94 (Suppl. II): 429-432.
- ARAÚJO PF, ALMEIDA AB, PIMENTEL CP, SILVA AR, SOUSA A, VALENTE SA, VALENTE VC, BRITTO MM, ROSA AC, ALVES RM, HAGSTRÖM L, TEIXEIRA ARL. Sexual transmission of American trypanosomiasis in humans: a new potential pandemic route for Chagas parasites. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. Vol. 112(6): 437-446, 2017.
- ARAYA JE, CANO MI, YOSHIDA N, DA SILVEIRA JF. Cloning and characterization of a gene for the stage-specific 82-kDa surface antigen of metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 65(1): 161-9, 1994.

- ARAYA JE, ORREGO PR, CORDERO EM, CÓRTEZ M, OLIVARES H, NEIRA I, SAQUA H, SILVERIA JF, YOSHIDA N, GONZÁLEZ J. Calcineurin B of the human protozoan parasite *Trypanosoma cruzi* is involved in cell invasion. *Microbes Infect.* 10:8, 892-900, 2008.
- ARIAS JL, UNCITI-BROCETA JD, MACEIRA J, DEL CASTILLO T, HERNÁNDEZ-QUERO J, MAGEZ S, SORIANO M, GARCÍA-SALCEDO JA. Nanobody conjugated PLGA nanoparticles for active targeting of African Trypanosomiasis. *J. Control. Release.* 197(10): 190-198, 2014.
- ARORA AK, FORSHAW A, MILLER TA, DURVASULA R. A delivery system for field application of paratransgenic control. *BMC Biotechnol.* 15: 59, 2015.
- ATWOOD JA III, WEATHERLY DB, MINNING TA, BUNDY B, CAVOLA C, OPPERDOES FR, ORLANDO R, TARLETON RL. (2005) The *Trypanosoma cruzi* proteome. *Science* 309:473-6, 2005.
- AYUB MJ, NYAMBEGA B, SIMONETTI L, DUFFY T, LONGHI SA, GOMEZ KA, HOEBEKE J, LEVIN MJ, SMULSKI CR. Selective Blockade of Trypanosomatid Protein Synthesis by a Recombinant Antibody Anti-*Trypanosoma cruzi* P2 β Protein. *PLoS ONE* 7(5), 2012.
- BARRIAS ES, DE CARVALHO TMU, DE SOUZA W. *Trypanosoma cruzi*: Entry into Mammalian Host Cells and Parasitophorous Vacuole Formation. *Frontiers in Immunology.* 4:186. doi:10.3389/fimmu.2013.00186, 2013.
- BARROS HC, SILVA S, VERBISCK NV, ARAGUTH MF, TEDESCO RC, PROCÓPIO DO, MORTARA RA. Release of membrane-bound trails by *Trypanosoma cruzi* amastigotes onto modified surfaces and mammalian cells. *The Journal of Eukaryotic Microbiology.* 43, 275-285, 1996.
- BARTHOLOMEU, D. C; CERQUEIRA, G. C; LEÃO, A. C. A; DAROCHA, W. D; PAIS, F. S; MACEDO, C; DJIKENG, A; TEIXEIRA, S. M. R; EL-SAYED, N. M. Genomic organization and expression profile of the mucin-associated surface protein (masp) family of the human pathogen *Trypanosoma cruzi*. *Nucleic Acids Research.* 37, 10, 3407-3417, 2009.
- BEERLI R.R., WELS W., HYNES N.E. Inhibition of signaling from Type 1 receptor tyrosine kinases via intracellular expression of single-chain antibodies. *Breast Cancer Res Treat.* 38:11-7, 1996.
- BESSETTE, P. *et al.* Efficient folding of proteins with multiple disulfide bonds in the *Escherichia coli* cytoplasm. *PNAS*, 96(24): 13703-08, 1999.
- BETTER M, CHANG CP, ROBINSON RR, HORWITZ AH. *Escherichia coli* secretion of an active chimeric antibody fragment. *Science*, vol. 240, no. 4855, pp. 1041–1043, 1988.
- BRÍGIDO MM, MARANHÃO AQ. Bibliotecas apresentadas em fagos. *Biotechnologia Ciência em Desenvolvimento.* 26, 44-51, 2002.
- BURLEIGH, B. A; WOOLSEY, A. M. Cell signalling and *Trypanosoma cruzi* invasion. *Cell. Microbiol.* v.11, p. 701–711, 2002.
- BOISSIÈRE A, TCHIOFFO MT, BACHAR D, ABATE L, MARIE A, et al. Midgut Microbiota of the Malaria Mosquito Vector *Anopheles gambiae* and Interactions with *Plasmodium falciparum* Infection. *PLoS Pathog.* 8(5): 2012.
- BUSCAGLIA CA, CAMPO VA, FRASCH ACC, DI NOIA JM. *Trypanosoma cruzi* surface mucins: host-dependent coat diversity. *Nature Reviews Microbiology.* 229: 4, 10.1038/nrmicro1351, 2006.
- CABILLY S, RIGGS AD, PANDE H, SHIVELY JE, HOMES WE, REY M, PERRY LJ, WETZEL R, HEYNEKER HL. Generation of antibody activity from immunoglobulin polypeptide chains produced in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 81, 11, 3273-3277, 1984.

CALER EV *et al.* Dual role of signaling pathways leading to Ca(2+) and cyclic AMP elevation in host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Infect. Immun.* 68, 6602-10, 2000.

CARVALHO CME, SILVERIO JC, DA SILVA AA, *et al.* Inducible Nitric Oxide Synthase in Heart Tissue and Nitric Oxide in Serum of *Trypanosoma cruzi*-Infected Rhesus Monkeys: Association with Heart Injury. Correa-Oliveira R, ed. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 6(5):e1644, 2012.

CHAGAS, C. Nova tripanozomíase humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, 1, 2, 159-218. 1909.

CHAMES P, VAN REGENMORTEL M, WEISS E, BATY D. Therapeutic antibodies: successes, limitations and hopes for the future. *Br J Pharmacol.* 157(2):220–33, 2009.

CIRIMOTICH CM, CLAYTON AM, DIMOPOULOS G. Low- and High-Tech approaches to control *Plasmodium* parasite transmission by Anopheles mosquitoes. *Journal of Tropical Medicine*. ID 891342, 2011.

COLLI, W. Trans-sialidase: a unique enzyme activity discovered in the protozoon *Trypanosoma cruzi*. *FASEB J.* 7, 1257-1264, 1993.

CONTRERAS V. T. *et al.* Biological aspects of the Dm 28c clone of *Trypanosoma cruzi* after metacyclogenesis in chemically defined media. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 83, p. 123–133, 1988.

CORTEZ M, ATAYDE V, YOSHIDA N. Host cell invasion mediated by *Trypanosoma cruzi* surface molecule gp82 is associated with F-actin disassembly and is inhibited by enteroinvasive *Escherichia coli*. *Microbes Infect.* 8(6):1502- 12, 2006.

COURA JR, VIÑAS PA. Chagas disease: a new worldwide challenge. *Nature*. 465, S6, 10.1038/nature09221, 2010.

DE FREITAS JM, AUGUSTO-PINTO L, PIMENTA JR, *et al.* Ancestral Genomes, Sex, and the Population Structure of *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Pathogens*. 2(3): e24, doi:10.1371/journal.ppat.0020024, 2006.

DE GENST E, SAERENS D, MUYLDERMANS S, CONRATH K. Antibody repertoire development in camelids. *Dev Comp Immunol.* 30(1-2):187–98, 2006.

de LEDERKREMER RM AND COLLI W. Galactofuranose-containing glycoconjugates in trypanosomatids. *Glycobiology*. 5:6, 547-552, 1995.

DE MARCO A. Biotechnological applications of recombinant single-domain antibody fragments. *Microb Cell Fact.* 10(1):44, 2011.

DE PABLOS LM, GONZÁLEZ GG, PARADA JS, HIDALGO VS, LOZANO IMD, SAMBLÁS MMG, BUSTOS TC, OSUNA A. Differential Expression and Characterization of a Member of the Mucin-Associated Surface Protein Family Secreted by *Trypanosoma cruzi*. *Infection and Immunity*. 79, 3993-4001, 2011.

DE PABLOS LM, GONZÁLEZ GG, PARADA JS, HIDALGO VS, LOZANO IMD, SAMBLÁS MMG, BUSTOS TC, OSUNA A. Differential expression and characterization of a member of the mucin-associated surface proteins (MASP) family secreted by *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun.* 79: 10, doi:10.1128/IAI.05329-11, 2011.

DE PABLOS LM, OSUNA A. Conserved Regions as Markers of Different Patterns of Expression and Distribution of the Mucin-Associated Surface Proteins of *Trypanosoma cruzi*. *Infection and Immunity*. 80, 169-174, 2012.

DE SOUZA W. Special organelles of some pathogenic protozoa. *Parasitol Res.* 88: 12, 1013-25, 2002.

DE SOUZA, W. Electron microscopy of trypanosomes - A historical view. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, vol. 103: 4, 313-325, 2008.

DE VOOCHT L, CALJON G, DE RIDDER K, VAN DEN ABEELE J. Delivery of a functional anti-trypanosome nanobody in different tsetse fly tissues via a bacterial symbiont, *Sodalis glossinidius*. *Microb Cell Factories*. 13:156, 2014.

DE WILDT, RMT, MUNDY CR, GORICK BD, TOMLINSON IM. Antibody arrays for high-throughput screening of antibody–antigen interactions. *Nature Biotechnology*. 18 (9): 989 – 94, 2000.

DI NOIA JM, D'ORSO I, ASLUND L, SÁNCHEZ DO, FRASCH AC. The *Trypanosoma cruzi* mucin family is transcribed from hundreds of genes having hypervariable regions. *J Biol Chem*. May; 273(18):10843-50, 1998.

DIAS JCP. Notas sobre o *Trypanosoma cruzi* e suas características bio-ecológicas, como agente de enfermidades transmitidas por alimentos. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 39(4):370-375, 2006.

DOCAMPO R, SCOTT DA, VERCESI AE, MORENO SN. Intracellular Ca²⁺ storage in acidocalcisomes of *Trypanosoma cruzi*. *Biochemical Journal*. 310, 3:1005-1012, 1995.

DOCAMPO, R.; DE SOUZA, W.; MIRANDA, K.; ROHLOFF, P.; MORENO, S. N. J. Acidocalcisomes — conserved from bacteria to man. *Nat Rev Microbiol*. vol. 3: 3, 251-261, 2005.

DOSREIS GA. Evasion of immune responses by *Trypanosoma cruzi*, the etiological agent of Chagas disease. *Braz. J. Biol. Res.* 44(2): 84-90, 2011.

DUAN L, POMERANTZ RJ. Elimination of endogenous aberrant kappa chain transcripts from sp2/0-derived hybridoma cells by specific ribozyme cleavage: utility in genetic therapy of HIV-1 infections. *Nucleic Acids Research*. 1994, vol.22, No.24. 5433- 5438, 1994.

DURANTE IM, LA SPINA PE, CARMONA SJ, AGUËRO F, BUSCAGLIA CA. High-resolution profiling of linear B-cell epitopes from mucin-associated surface proteins (MASPs) of *Trypanosoma cruzi* during human infections. *PLoS Negl Trop Dis* 11(9): e0005986. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005986>, 2017.

DURVASULA RV, KROGER A, GOODWIN M, PANACKAL A, KRUGLOV O, TANEJA J, GUMBS A, RICHARDS FF, BEARD CB, CORDON-ROSALES C. Strategy for introduction of foreign genes into field populations of Chagas disease vectors. *Ann Entomol Soc Am*. 92:937–943, 1999.

EL-SAYED N. *et al.* The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science*. 309, 5733, 409-415, 2005.

EL-SAYED, N. M; MYLER, P. J; BARTHOLOMEU, D. C; NILSSON, D; AGGARWAL, G. *et al.* The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science*. 309, 5733, 409-415, 2005a.

FAVORETO S Jr, DORTA ML, YOSHIDA N. *Trypanosoma cruzi* 175-kDa protein tyrosine phosphorylation is associated with host cell invasion. *Experimental Parasitology*. 89, 2, 188–194, 1998.

FERREIRA D, CORTEZ M, ATAYDE VD, YOSHIDA N. Actin Cytoskeleton-Dependent and -Independent Host Cell Invasion by *Trypanosoma cruzi* Is Mediated by Distinct Parasite Surface Molecules. *Infection and Immunity*. 74(10):5522-5528, 2006.

FERREIRA MS, NISHIOKA SDEA, SILVESTRE MT, BORGES AS, NUNES-ARAUJO FR, ROCHAN A. Reactivation of Chagas' disease in patients with AIDS: report of three new cases and review of the literature. Clin Infect dis. 25: 1397-400, 1997.

FIELDS C, O'CONNELL D, XIAO S, LEE GU, BILLIALD P, MUZARD J. Creation of recombinant antigen-binding molecules derived from hybridomas secreting specific antibodies. Nature Protocol, 8(6):1125-48, 2013.

FILARDI LS, BRENER Z. Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. Trans. R. Trop. Med. Hyg. 81: 755-759, 1987.

FILPULA D. Antibody engineering and modification technologies. Biomolecular Engineering. 24, 201-215, 2007.

FONSECA LM, GARCEZ TC, PENHA L, FREIRE-DE-LIMA L, MAES E, COSTA KM, MENDONÇA-PREVIATO L, PREVIATO JO. Expanding the knowledge of the chemical structure of glycoconjugates from *Trypanosoma cruzi* TcI genotype. Contribution to taxonomic studies. An Acad Bras Cienc. Sep;88(3):1519-29, 2016.

FRASCH, A.C. Functional diversity in the trans-sialidase and mucin families in *Trypanosoma cruzi*. Parasitol. Today. 16, 282-286, 2000.

FREITAS, L.M. et al. Genomic Analyses, Gene Expression and Antigenic Profile of the Trans-Sialidase Superfamily of *Trypanosoma cruzi* Reveal an Undetected Level of Complexity. PLoS ONE. 6, 10, e25914, 2011.

GAHRTZ M, CONRAD U. Immunomodulation of plant function by in vitro selected single-chain Fv intrabodies. Methods Mol Biol. 483:289-312, 2009.

GALHARDO MC, MARTINS IA, HASSLOCHER-MORENO A, XAVIER SS, COELHO JM, JUNQUEIRA AC, DOS SANTOS RR. Reativação da infecção por *Trypanosoma cruzi* em pacientes com síndrome de imunodeficiência adquirida. Rev Soc Bras Med Trop. 32: 291-4, 1999.

GALLO G, RAMOS TCP, TAVARES F, ROCHA AA, MACHI, E, et al. Biochemical characterization of a protein tyrosine phosphatase from *Trypanosoma cruzi* involved in metacyclogenesis and invasion. Biochem Biophys Res Commun. 408: 427-431, 2011.

GARG N, NUNES MP, TARLETON RL. Delivery by *Trypanosoma cruzi* of proteins into the MHC class I antigen processing and presentation pathway. J. Immunol., 158: 3293-3302, 1997.

GAZZINELLI RT, OSWALD IP, HIENY S, JAMES SL, SHER A. The microbicidal activity of interferon-gamma-treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves in the L-arginine-dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhibitable by interleukin-10 and transforming growth factor-beta. European Journal of Immunology. 22, 2501-2506, 1992.

GHOORAH AW, DEVIGNES MD, SMAÏL-TABBONE M, RITCHIE DW. Protein docking using case-based reasoning. Proteins 2013.

GOLGHER DB, COLLI W, SOUTO-PADRÓN T, ZINGALES B. Galactofuranose-containing glycoconjugates of epimastigote and trypomastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. Mol Biochem Parasitol. 60(2):249-64, 1993.

HAMERS-CASTERMAN C, ATARHOUGH T, MUYLDERMANS S, ROBINSON G, HAMMERS C, BAJYANA SONGA E, et al. Naturally occurring antibodies devoid of light chains. Nature. 363:446-8, 1993.

HANWELL MD, CURTIS DE, LONIE DC, VANDERMEERSCH T, ZUREK E, HUTCHISON GR. "Avogadro: An advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform" Journal of Cheminformatics. 4:17, 2012.

- HARWERTH I.M., WELS W., SCHLEGEL J., MULLER M., HYNES N.E. Monoclonal antibodies directed to the erbB-2 receptor inhibit in vivo tumour cell growth. *British J Cancer*. 68:1140-5, 1993.
- HOFT DF, FARRAR PL, KRATZ-OWENS K, SHAFFER D. Gastric invasion by *Trypanosoma cruzi* and induction of protective mucosal immune responses. *Infection and Immunity*. 1996;64(9):3800-3810.
- HOFT DF, KIM KS, OTSU K, MOSER DR, YOST WJ, BLUMIN JH, DONELSON JE, KIRCHHOFF LV. *Trypanosoma cruzi* expresses diverse repetitive protein antigens. *Infect Immun*. 57:1959-67, 1989.
- HURWITZ I, FIECK A, READ A, HILLESLAND H, KLEIN N, KANG A, DURVASULA R. Paratransgenic Control of Vector Borne Diseases. *International Journal of Biological Sciences*. 7(9):1334-1344, 2011.
- HUST M, JOSTOCK T, MENZEL C *et al*. Single chain Fab (scFab) fragment. *BMC Biotechnology*. 7, 14, 2007.
- ISAACS AT, JASINSKIENE N, TRETIKOV M, THIERY I, ZETTOR A, BOURGOUIN C, JAMES AA. Transgenic *Anopheles stephensi* coexpressing single-chain antibodies resist *Plasmodium falciparum* development. *Proc Natl Acad Sci USA* 109(28), 2012.
- JAHN, RS. CLONAGEM E CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DE ANTICORPO RECOMBINANTE ANTI-GP35/50 DE *Trypanosoma cruzi*. Curitiba, 2014. 88p. Dissertação (Mestrado) – Departamento de Patologia Básica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.
- KALADHAR SVGK, SUPRIYA AM, DUDDUKURI GR, CHAITANYA AK. Predicting molecular interactions *in silico*: hhex-drug docking approaches on D2M. *Journal of Advanced Bioinformatics Applications and Research*. 2(3), 177-182, 2011.
- KHANTASUP K, CHANTIMA W, SANGMA C, POOMPUTSA K, DHARAKUL T. Design and Generation of Humanized Single-chain Fv derived from mouse hybridoma for potential targeting application. *Monoclonal antibodies in immunodiagnosis and immunotherapy*. 6: 34, 2015.
- KIM KM, MCDONAGH CF, WESTENDORF L, BROWN LL, SUSSMAN D, FEIST T, LYON R, ALLEY SC, OKELEY NM, ZHANG X. Anti-CD30 diabody-drug conjugates with potent antitumor activity. *Mol Cancer Ther* 7: 2486-2497, 2008.
- KOHLER G, MILSTEIN C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*. 256, 495-497, 1975.
- KRETTLI AU, BRENER Z. Resistance against *Trypanosoma cruzi* associated to anti-living trypomastigote antibodies. *The Journal of Immunology*. 128, 2009, 1982.
- LEY V, ROBBINS ES, NUSSENZWEIG V, ANDREWS NW. The exit of *Trypanosoma cruzi* from the phagosome is inhibited by raising the pH of acidic compartments, *Journal of Experimental Medicine*. 171, 2, 401-413, 1990.
- LIM KP, LI H, NATHAN S. Expression and purification of a recombinant scFv towards the exotoxin of the pathogen, *Burkholderia pseudomallei*. *Journal of Microbiology*. 42: 126-132, 2004.
- LIU J, YANG M, WANG J, XU Y, WANG Y, SHAO X, YANG C, GAO Y, XIONG D. Improvement of tumor targeting and antitumor activity by a disulphide bond stabilized diabody expressed in *Escherichia coli*. *Cancer Immunol Immunother*; 58(11): 1761-9, 2009.
- LYSKOV S, CHOU F-C, CONCHÚIR SÓ, DER BS, DREW K, *et al*. Serverification of Molecular Modeling Applications: The Rosetta Online Server That Includes Everyone (ROSIE). *PLoS ONE*. 8:5, 2013.

- MACEDO AM, MARTINS MS, CHIARI E, PENA SDJ. DNA fingerprinting of *Trypanosoma cruzi*: A new tool for characterization of strains and clones. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 55, 1–2, 147–153, 1992.
- MAEDA FY, CORTEZ C, YOSHIDA N. Cell signaling during *Trypanosoma cruzi* invasion. *Frontiers in Immunology*. 3:361, 2012.
- MANOEL-CAETANO F, SILVA ME. Implications of genetic variability of *Trypanosoma cruzi* for the pathogenesis of Chagas disease. *Cad. Saúde Pública*. 23(10): 2263–2274, 2007.
- MANQUE PM, EICHINGER D, JULIANO MA, JULIANO L, ARAYA J AND YOSHIDA N. 2000. Characterization of the cell adhesion site of *Trypanosoma cruzi* metacyclic stage surface glycoprotein gp82. *Infect Immun* 68: 478–484.
- MANQUE PM, EICHINGER D, JULIANO MA, JULIANO L, ARAYA J AND YOSHIDA N. Characterization of the cell adhesion site of *Trypanosoma cruzi* metacyclic stage surface glycoprotein gp82. *Infect Immun*. 68: 478–484, 2000.
- MARANHÃO A. Q; BRÍGIDO M. M. Anticorpos Humanizados – Humanização de Anticorpos de Interesse Clínico. *Biotechnology, Ciência & Desenvolvimento*. 23: 38–43, 2001.
- MARASCO WA, SUI J. The growth and potencial of human antiviral monoclonal antibody therapeutics. *Nature*. 25, 1421–1433, 2007.
- MARSCHALL AL, SINGLE FN, SCHLARMANN K, BOSIO A, STREBE N, VAN DEN HEUVEL J, FRENZEL A, D€UBEL S. Functional knock down of VCAM1 in mice mediated by endoplasmatic reticulum retained intrabodies. *mAbs*. 6:1394–401, 2014.
- MARSCHALL ALJ, D€UBEL S, B€OLDICKE T. Specific *in vivo* knockdown of protein function by intrabodies. *Mabs. mAbs*. 7:6, 1010 - 1035, 2015.
- MATHEW JA, RAJ NN. Docking studies on anticancer drugs for breast cancer using Hex. *Proceedings of the International Multi conference of Engineers and Computer Scientists*, Vol1, 2009.
- MCGUFFIN LJ, ATKINS J, SALEHE BR, SHUID AN, ROCHE DB. IntFOLD: an integrated server for modelling protein structures and functions from amino acid sequences. *Nucleic Acids Research*. 43, W169–73, 2015.
- MENDONÇA-PREVIATO L, PENHA L, GARCEZ TC, JONES C, PREVIATO JO. Addition of alpha-O-GlcNAc to threonine residues define the post-translational modification of mucin-like molecules in *Trypanosoma cruzi*. *Glycoconj J*. 30:659–666, 2013.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE, Governo Federal. Doença de Chagas. Disponível em <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/secretarias/svs/doenca-de-chagas>>, último acesso em 08 de maio de 2018.
- MONCAYO A, SILVEIRA AC. Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 104 Suppl 1:17–30, 2009.
- MORAIS MSS, PEREIRA SS, STÁBELI RG, CELEDONIO FERNANDES CF. Engenharia de anticorpos na busca por fragmentos funcionais para insumos de diagnóstico e aplicações terapêuticas. *Rev Ciênc Farm Básica Apl*. 35(4):633–642, 2014.
- MOREL C, CHIARI E, CAMARGO EP, MATTEI DM, ROMANHA AJ, SIMPSON L. Strains and clones of *Trypanosoma cruzi* can be characterized by pattern of restriction endonuclease products of kinetoplast DNA minicircles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 77(11):6810–6814, 1980.

- MORENO SNJ *et al.* Cytosolic free calcium elevation in *Trypanosoma cruzi* is required for cell invasion. *Exp. Med.* 180, 1535–1540, 1994.
- MORTARA RA, SILVA S, ARAGUTH MF, BLANCO SA, YOSHIDA N. Polymorphism of the 35- and 50-kilodalton surface glycoconjugates of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes. *Infect Immun* 60: 4673-4678, 1992.
- NEIRA I, SILVA FA, CORTEZ M, YOSHIDA N. Involvement of *Trypanosoma cruzi* Metacyclic Trypomastigote Surface Molecule gp82 in Adhesion to Gastric Mucin and Invasion of Epithelial Cells . *Infection and Immunity*. 71(1):557-561. doi:10.1128/IAI.71.1.557-561.2003.
- NÓBREGA AA, GARCIA MH, TATTO E, OBARA MT, COSTA E, SOBEL J, ARAÚJO WN. Oral Transmission of Chagas Disease by Consumption of Açaí Palm Fruit, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*. 15, 4, 2009.
- NORRIS KA. GALVÃO LM, SCHRIMPF JE, CANÇADO JR, KRETTLI AU. Humoral immune response to the *T. cruzi* complement regulatory protein as an indicator of parasitologic clearance in human Chaga's disease. *Infection and Immunity*. 62, 4072-4074, 1994.
- OBISHAKIN E, STIJLEMANS B, SANTI-ROCCA J, VANDENBERGHE I, DEVREESE B, *et al.* Generation of a Nanobody Targeting the Paraflagellar Rod Protein of Trypanosomes. *PLoS ONE* 9(12): e115893. doi:10.1371/journal.pone.0115893, 2014.
- OLIVEIRA KG. IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE CLONES EXPRESSANDO PEPTÍDEOS LIGANTES À SUPERFÍCIE DE *Trypanosoma cruzi*. Curitiba, 2015. 45p. Trabalho de Conclusão de Curso (Biomedicina) – Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.
- OSSYSEK K, UCHAŃSKI T, KULESZA M, BZOWSKA M, KLAUS T, WOŚ K, MADEJ M, BERETA JA. New expression vector facilitating production and functional analysis of scFv antibody fragments selected from Tomlinson I+J phagemid libraries. *Immunol Lett*. Oct;167(2):95-102, 2015.
- OUAISSI A, OUAISSI M. Molecular basis of *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* interaction with their host(s): exploitation of immune and defense mechanisms by the parasite leading to persistence and chronicity, features reminiscent of immune system evasion strategies in cancer diseases. *Arch Immunol Ther Exp*. 53: 102-114. 2005.
- PACHECO RS, BRITO CM. Reflections on the Population Dynamics of *Trypanosoma cruzi*: Heterogeneity Versus Plasticity. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 94, 199-201, 1999.
- PATEL UH, BAROT RA, PATEL BD, SHAH DA, MODH RD. Docking studies of pyrrole derivatives using Hex. *International Journal of Environmental Sciences*. 2 (3), 1765-1770, 2012.
- PEREIRA MEA, ZHANG K, GONG Y, HERRERA EM, MING M. Invasive phenotype of *Trypanosoma cruzi* restricted to a population expressing trans-sialidase. *Infection and Immunity*. 64, 9, 3884–3892, 1996.
- PEREIRA-CHIOCCOLA VL, ACOSTA-SERRANO A, DE ALMEIDA IC, FERGUSON MAJ, SOUTO-PADRON T, RODRIGUES MM, TRAVASSOS LR, SCHENKMAN S. Mucin-like molecules form a negatively charged coat that protects *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes from killing by human anti- α -galactosyl antibodies. *Journal of Cell Science*. 113, 7, 1299–1307, 2000.
- PEREZ L, AYALA M, PIMENTEL G, BELL H, CANAAN-HADEN L, BEQUET M, GONZALEZ LJ, MIRANDA M, RAVELO R, ROQUE L, ACEVEDO B, JUAN OP, GAVILONDO JV. A multivalent recombinant antibody fragment specific for carcinoembryonic antigen. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 43(Part 1): 39-48, 2006.

PONTES VMO, JÚNIOR ASS, CRUZ FMT, COELHO HLL, DIAS ATM, COELHO ICB, OLIVEIRA MF. Reações adversas em pacientes com doença de Chagas tratados com benzonidazol, no Estado do Ceará. *Rev Soc Bras Med Trop*. 43(2):182-187, 2010.

PREVIATO JO, JONES C, GONÇALVES LP, WAIT R, TRAVASSOS LR AND MENDONÇA-PREVIATO L. O-glycosidically linked N-acetylglucosamine-bound oligosaccharides from glycoproteins of *Trypanosoma cruzi*. *Biochem J*. 301: 151–159, 1994.

PREVIATO JO, WAIT R, JONES C, DOSREIS GA, TODESCHINI AR, HEISE N, PREVIATO LM. Glycoinositolphospholipid from *Trypanosoma cruzi*: structure, biosynthesis and immunobiology. *Adv Parasitol*. 56:1-41, 2004.

PRIOLI RP, MEJIA JS, PEREIRA MEA. Monoclonal antibodies against *Trypanosoma cruzi* neuraminidase reveal enzyme polymorphism, recognize a subset of trypomastigotes, and enhance infection *in vitro*. *Journal of Immunology*. 144, 11, 4384–4391, 1990.

RAMIREZ MI, RUIZ RC, ARAYA JE, Da SILVEIRA JF, YOSHIDA N. Involvement of the stage-specific 82-kilodalton adhesion molecule of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes in host cell invasion. *Infection and Immunity*. 61, 9, 3636–3641, 1993.

RASSI A, LUQUETTI AO. Therapy of Chagas disease. In: Chagas disease (American Trypanosomiasis): its impact on transfusion and clinical medicine. ISBT Brazil, São Paulo; 237-247, 1992.

RASSI A, RASSI JA, RASSI GG. Fase aguda. In: *Trypanosoma cruzi* e a doença de Chagas. 2.^a Edição. Brener, Z, Andrade, ZA, Barral-Netto, M. Rio de Janeiro, 231-244, 2000.

RENARD C, GRENE-LEROUGE N, BEAU N, BAUD F, SCHERRMANN JM. Pharmacokinetics of digoxin-specific fab: effects of decreased renal function and age. *Br J Clin Pharmacol*. 44(2):135–8, 1997.

RIOS A, RIBEIRO M, SOUSA A, PIMENTEL F, HAGSTRÖM L, ANDRADE R, ALVES RM, ROSA AC, TEIXEIRA ARL, NITZ N, HECHT MM. Can sexual transmission support the enzootic cycle of *Trypanosoma cruzi*? *Mem Inst Oswaldo Cruz*. Vol. 113(1): 3-8, 2018.

RIPPMAN JF, KLEIN M, HOISCHEN C, BROCKS B, RETTIG WJ, GUMPERT J, ROBINSON DR, GULL K. Basal body movements as a mechanism for mitochondrial genome segregation in the trypanosome cell cycle. *Nature*. 352:731–733, 1991.

RIVERA J, HILLIS LD, LEVINE BD. Reactivation of cardiac Chagas' disease in acquired immune deficiency syndrome. *Am J Cardiol*. 94: 1102-3, 2004.

ROCHA A, RAMOS JR AN, SARTORI AMC, CORREA D, GONTIJO ED, TATTO E, ALMEIDA E, PEREIRA GF, SILVA JC, FIGUEREDO JFC, FERREIRA MS, SHIKANAI-YASUDA MA, PONTES RJS, SANTOS SOS. Recomendações para diagnóstico, tratamento e acompanhamento a co-infecção *Trypanosoma cruzi* - vírus da imunodeficiência humana. *Rev Soc Bras Med Trop*. 39:392-415, 2006.

RODRIGUEZ, A. *et al.* A trypanosome-soluble factor induces IP3 formation, intracellular Ca²⁺ mobilization and microfilament rearrangement in host cells. *J. Cell Biol*. v. 129, p. 1263-1273, 1995.

RODRÍGUEZ, A. *et al.* Lysosomes behave as Ca²⁺-regulated exocytic vesicles in fibroblasts and epithelial cells. *J. Cell Biol*, 1997.

ROQUE, A.C.A., LOWE, C.R., TAIPA, M.A. Antibodies and Genetically Engineered Related Molecules: Production and Purification. *Biotechnology Progress*. v. 20, p. 639-654, 2004.

RUIZ RC, FAVORETO Jr S., DORTA ML, OSHIRO MEM, FERREIRA AT, MANQUE PM, YOSHIDA N. Infectivity of *Trypanosoma cruzi* strains is associated with differential expression of surface glycoproteins with differential Ca²⁺ signalling activity. *Biochemical Journal*. 330, 1, 505–511, 1998.

RUSSO DC, WILLIAMS DJ, GRAB DJ. Mechanisms for the elimination of potentially lytic complement-fixing variable surface glycoprotein antibody complexes in *Trypanosoma brucei*. *Parasitol Res*. 80: 487–492, 1994.

SALTO ML, GALLO-RODRIGUEZ C, LIMA C AND LEDERKREMER RM. Separation of gal β 1 \rightarrow XGlcNAc and gal β 1 \rightarrow XGlcNAc (X = 3, 4, and 6) as the alditols by high-pH anionexchange chromatography and thin-layer chromatography: characterization of mucins from *Trypanosoma cruzi*. *Anal Biochem*. 279: 79–84, 2000.

SAMBROOK J, FRITSCH EF, MANIATIS T. *Molecular Cloning: a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SANTORI FR, PARANHOS-BACALLA GS, FRANCO DA SILVEIRA J, YAMAUCHI LM, ARAYA JE, YOSHIDA N. A recombinant protein based on the *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigote 82-kilodalton antigen that induces an effective immune response to acute infection. *Infection and Immunity*. 64(4):1093-1099, 1996.

SANTOS, R. V. *et al.* Aplicações terapêuticas dos anticorpos monoclonais. *Rev. bras. alerg. imunopatol*. 29: 2, 2006.

SANTORI AMC, IBRAHIM KY, NUNES WESTPHALEN EV, BRAZ LM, OLIVEIRA OCJR, GAKIYA E, LOPES MH, SHIKANAI-YASUDA MA. Manifestations of Chagas disease (American trypanosomiasis) in patients with HIV/AIDS. *Am Trop Med Parasitol*. 101: 31-50, 2007.

SANTORI AMC, LOPES MH, CARAMELLI B, DUARTE MI, PINTO PL, AMATO-NETO V, SHIKANAI-YASUDA MA. Simultaneous occurrence of acute myocarditis and reactivated Chagas' disease in a patient with AIDS. *Clin Infect Dis*. 21: 1297-9, 1995.

SANTORI AMC, SOTTO MN, BRAZ LMA, JUNIOR OCO, PATZINA RA, BARONE AC, SHIKANAI-YASUDA MA. Reactivation of Chagas disease manifested by skin lesions in a patient with AIDS. *Trans Royal Soc Trop Med Hyg*. 93: 631-2, 1999.

SCHARFSTEIN, J. *et al.* Host cell invasion by *Trypanosoma cruzi* is potentiated by activation of bradykinin B (2) receptors. *J. Exp. Med*. v.192, p 1289-300, 2000.

SCHOFIELD CJ. *Trypanosoma cruzi* - The Vector-parasite Paradox. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 95(4): 535-544, 2000.

SCOTT P, TRINCHIERI G. The role of natural killer cells in host-parasite interactions. *Current Opinion in Immunology*. 7, 34, 1995.

SKERRA A, PÜCKTHUN A. Assembly of a functional immunoglobulin Fv fragment in *Escherichia coli*. *Science*, vol. 240, no. 4855, pp. 1038–1041, 1988.

SOUZA W, CARVALHO TMU, BARRIAS ES. Review on *Trypanosoma cruzi*: Host Cell Interaction, *International Journal of Cell Biology*, Article ID 295394, 2010.

STEINDEL M. Caracterização de cepas de *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma rangeli* isoladas de reservatórios e vetores silvestres naturalmente infectados de Santa Catarina. Belo Horizonte, 1993. 162p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais.

STERNBERG JM. Human African trypanosomiasis: clinical presentation and immune response. *Parasite Immunol* 26: 469–476, 2004.

STIJLEMANS B, CALJON G, NATESAN SK, SAERENS D, CONRATH K, PÉREZ-MORGA D, SKEPPER JN, NIKOLAOU A, BRYL L, PAYS E, MAGEZ S, FIELD MC, DE BAETSELIER P, MUYLDERMANS S. High affinity nanobodies against the *Trypanosoma brucei* VSG are potent trypanolytic agents that block endocytosis. PLoS Pathog. Jun;7(6), 2011.

STRASEN J, WILLIAMS T, ERTL G, ZOLLER T, STICH A, RITTER O. Epidemiology of Chagas disease in Europe: many calculations, little knowledge. Clinical Research in Cardiology. 10, 103, 2014.
STUART, K.; et al. Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. J. Clin. Invest, 118(4): 1301-1310, 2008.

SUDOL KL, MASTRANGELO MA, NARROW WC, FRAZER ME, LEVITES YR, GOLDE TE, FEDEROFF HJ, BOWERS WJ. Generating differentially targeted amyloid- β specific intrabodies as a passive vaccination strategy for Alzheimer disease. Mol Ther. 17:2031-40, 2009.

TANOWITZ HB, WEISS LM, MONTGOMERY SP. Chagas Disease Has Now Gone Global. PLoS Neglected Tropical Diseases. 5(4):e1136. doi:10.1371/journal.pntd.0001136, 2011.

TARACENA ML, OLIVEIRA PL, ALMENDARES O, UMANA C, LOWENBERGER C, DOTSON EM, PAIVA-SILVA GO, PENNINGTON PM. Genetically modifying the insect gut microbiota to control Chagas disease vectors through systemic RNAi. PLoS Neglect Trop Dis. 9:e0003358, 2015.

TARLETON RL. Immune System Recognition of *Trypanosoma cruzi*. Curr Opin Immunol., 19(4): 430-4, 2007.

TIBAYRENC M, AYALA JF. Isozyme variability in *Trypanosoma cruzi*, the agent of chagas' disease: genetical, taxonomical, and epidemiological significance. Evolution. 42. 277-292, 1988.

TIBAYRENC M, NEUBAUER K, BARNABÉ C, GUERRINI F, SKARECKY D, AYALA FJ. Genetic characterization of six parasitic protozoa: parity between random-primer DNA typing and multilocus enzyme electrophoresis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 90(4):1335-1339, 1993.

TOLEDO MJ, BAHIA MT, CARNEIRO CM, MARTINS-FILHO AO, TIBAYRENC M, BARNABE C, TAFURI WL, DE LANA M. Chemotherapy with benznidazole and itraconazole for mice infected with different *Trypanosoma cruzi* clonal genotypes. Antimicrob. Agents & Chemother. 47, 223-30, 2003.

TYLER, KM, ENGMAN DM. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited International Journal for Parasitology, 31, 472-481, 2001.

VILLALTA F, MADISON MN, KLESHCHENKO, LIMA MF. Molecular analysis of early host cell infection by *Trypanosoma cruzi*. Frontiers in Bioscience. 13, 10, 3714-3734, 2008.

VILLEGAS, L. M.; PIMENTA, P. F. P. Metagenomics, paratransgenesis and the Anopheles microbiome: a portrait of the geographical distribution of the anopheline microbiota based on a meta-analysis of reported taxa. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 109:5, 672-684, 2014.

VINCKE C, LORIS R, SAERENS D, MARTINEZ-RODRIGUEZ S, MUYLDERMANS S, CONRATH K. General strategy to humanize a camelid single-domain antibody and identification of a universal humanized nanobody scaffold. J Biol Chem. 284(5):3273-84, 2009.

VINCKE C, MUYLDERMANS S. Single Domain Antibodies. Saerens D, Muyldermans S, editors. Totowa, NJ: Humana Press. 911(1):15-26, 2012.

WANG X, PALASUBRAMANIAM J, GKANATSAS Y, HOHMANN JD, WESTEIN E, KANOJIA R, ALT K, HUANG D, JIA F, AHRENS I, MEDCALF RL, PETER K, HAGEMEYER CE. Towards effective and safe thrombolysis and thromboprophylaxis: preclinical testing of a novel antibody-targeted recombinant plasminogen activator directed against activated platelets. Circulation Research. 28;114(7):1083-93, 2014.

- WANG, S. et al. Fighting malaria with engineered symbiotic bacteria from vector mosquitoes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 109, n. 31, p. 12734–12739, 2012.
- WANG, S.; JACOBS-LORENA, M. Genetic approaches to interfere with malaria transmission by vector mosquitoes. *Trends in Biotechnology*, v. 31, n. 3, p. 185–193, 2013.
- WESOLOWSKI J, et al. Single domain antibodies: promising experimental and therapeutic tools in infection and immunity. *Med Microbiol Immunol*.198(3):157–74, 2009.
- WHITLOW M, BELL BA, FENG SL et al. An improved linker for single-chain Fv with reduced aggregation and enhanced proteolytic stability. *Protein Engineering*. 6, 8, 989–995, 1993.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Health Topics, Chagas disease, 2017. http://www.who.int/topics/chagas_disease/en/. Accessed 04 março 2018.
- YOSHIDA N, BLANCO SA, ARAGUTH MF, RUSSO M, GONZALEZ J. The stage-specific 90-kilodalton surface antigen of metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 39: 39–46, 1990.
- YOSHIDA N, CORTEZ M. *Trypanosoma cruzi*: parasite and host cell signaling during the invasion process. *Sub-Cellular Biochemistry*, 47, 82–91, 2008.
- YOSHIDA N, DORTA ML, FERREIRA AT, OSHIRO ME, MORTARA RA, ACOSTA-SERRANO A, FAVORETO JÚNIOR S. Removal of sialic acid from mucin-like surface molecules of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes enhances parasite-host cell interaction. *Mol Biochem Parasitol*. Jan;84(1):57-67, 1997.
- YOSHIDA N, Molecular basis of mammalian cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias*, vol. 78, no. 1, pp. 87–111, 2006.
- YOSHIDA N, Molecular basis of mammalian cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias*. 78, 1, 87–111, 2006.
- YOSHIDA N, MORTARA RA, ARAGUTH MF, GONZALES JC, RUSSO M. Metacyclic neutralizing effect of monoclonal antibody 10D8 directed to the 35- and 50-kilodalton surface glycoconjugates of *Trypanosoma cruzi*. *Infection and Immunity*. 57, 6, 1663–1667, 1989.
- YUSAKUL G, SAKAMOTO S, NUNTAWONG P, TANAKA H, MORIMOTO S. Different expression systems resulted in varied binding properties of anti-paclitaxel single-chain variable fragment antibody clone 1C2. *J Nat Med*. <https://doi.org/10.1007/s11418-017-1136-z>. 2017.
- ZHANG C, HELMSING S, ZAGREBELSKY M, SCHIRRMANN T, MARSCHALL AL, SCHÜNGEL M, KORTE M, HUST M, DEUBEL S. Suppression of p75 neurotrophin receptor surface expression with intrabodies influences Bcl-xL mRNA expression and neurite outgrowth in PC12 cells. *PLoS One*. 7:e30684, 2012.
- ZHANG J, MACKENZIE R, DUROCHER Y. Production of Chimeric Heavy-Chain Antibodies. In: Dimitrov A S, editor. *Therapeutic Antibodies: methods and protocols*. Humana Press; Series: Methods Mol Biol. 525(1):323–36, 2009.
- ZINGALES, B et al. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 104:7, 1051-1054, 2009.

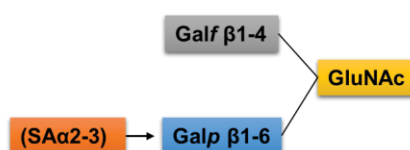
9. ANEXOS

ANEXO I: Esquema representativo das estruturas químicas de carboidratos testadas no ensaio de acompanhamento *in silico*

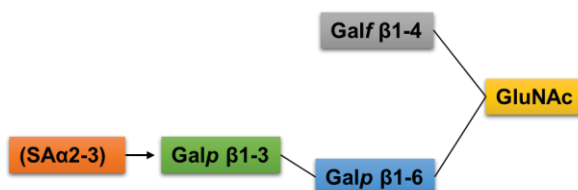
A.



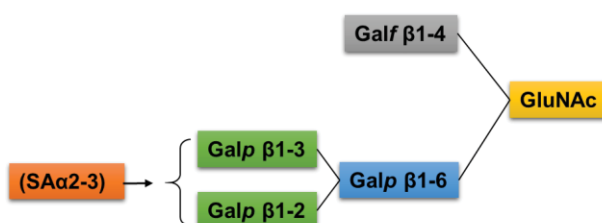
B.



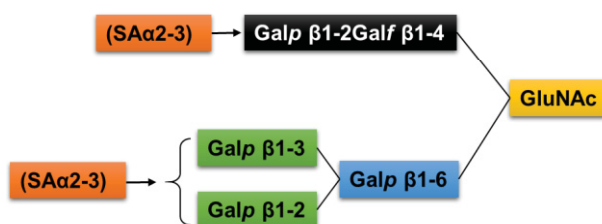
C.



D.



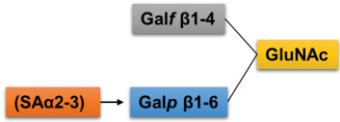
E.

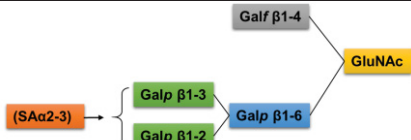


FONTE: Adaptado de ACOSTA-SERRANO *et al.*, 1995.

NOTA: Estruturas propostas dos oligossacarídeos liberados de mucinas de epimastigotas e tripomastigotas metacíclicos.

ANEXO II: Tabelas contendo as energias de acoplamento *in silico* entre moléculas glicídicas e scFv-10D8.

		Estrutura química+treonina			Substituir por Galp	Sem Galf (β1→4)
Docking	Energia	Energia	Galf (β1→4) Interação	Treonina livre	Energia	Energia
1	-220.0	-234.3			-210.6	-201.3
2	-198.7	-219.5			-203.5	-172.6
3	-198.5	-213.1			-198.1	-165.2
4	-194.2	-205.3			-194.5	-160.9
5	-190.7	-199.4			-191.0	-157.2
6	-190.3	-198.4			-187.9	-154.4
7	-187.3	-196.8			-185.0	-151.8
8	-184.8	-194.8			-182.8	-149.7
9	-184.2	-192.8			-180.5	-147.5
10	-183.7	-189.5			-178.4	-145.6
11	-183.7	-188.5			-176.6	-143.9
12	-183.1	-187.0			-174.9	-142.1
13	-182.0	-186.3			-173.2	-140.7
14	-181.9	-186.0			-171.6	-139.2
15	-181.9	-185.8			-170.1	-137.8
16	-181.0	-185.4			-168.5	-136.6
17	-181.0	-185.2			-167.1	-135.4
18	-179.4	-184.8			-165.8	-134.1
19	-179.2	-184.3			-164.3	-133.1
20	-178.8	-183.6			-163.0	-131.7

		Estrutura química+treonina			Substituir por Galp	Sem Galf (β1→4)
Docking	Energia	Energia	Galf (β1→4) Interação	Treonina livre	Energia	Energia
1	-303.2	-307.3			-285.9	-262.5
2	-249.9	-263.4			-274.9	-250.3
3	-243.0	-255.2			-266.5	-241.8
4	-237.4	-249.0			-260.7	-236.4
5	-233.0	-243.1			-256.0	-232.2
6	-228.9	-239.2			-251.8	-228.5
7	-225.7	-234.8			-247.7	-225.2
8	-222.5	-231.4			-244.3	-222.1
9	-219.6	-227.8			-240.8	-219.0

10	-217.1	-224.2			-238.2	-216.5
11	-214.7	-220.9			-235.7	-214.1
12	-212.1	-217.8			-233.3	-211.9
13	-209.9	-214.8			-230.9	-209.8
14	-207.8	-212.0			-228.3	-207.7
15	-205.9	-209.5			-225.8	-205.6
16	-203.9	-207.4			-223.1	-203.6
17	-202.1	-205.1			-220.4	-201.6
18	-200.3	-202.7			-217.9	-199.5
19	-198.6	-200.2			-215.5	-197.7
20	-197.1	-197.8			-213.0	-195.5

		Estrutura química+treonina			Substituir por Galp	Sem Galf (β1→4)
Docking	Energia	Energia	Galf (β1→4) Interação	Treonina livre	Energia	Energia
1	-261.5	-293.4			-283.0	
2	-249.6	-272.2			-272.4	
3	-242.3	-265.7			-265.5	
4	-237.2	-263.6			-260.3	
5	-233.2	-260.7			-255.8	
6	-229.8	-258.3			-251.5	
7	-226.7	-257.1			-247.7	
8	-224.1	-252.1			-244.7	
9	-221.7	-251.9			-241.7	
10	-219.4	-249.8			-239.3	
11	-217.3	-249.6			-236.6	
12	-215.1	-247.7			-234.5	
13	-213.0	-246.9			-231.9	
14	-211.0	-245.7			-229.7	
15	-209.1	-245.4			-227.2	
16	-207.2	-243.7			-225.2	
17	-205.6	-243.6			-223.2	
18	-203.7	-243.1			-221.5	
19	-201.9	-242.1			-219.	
20	-200.2	-241.9			-218.1	

NOTA: Coluna de docking: 1-20 Possibilidade de acoplamento *in silico* realizado pelo Hex Protein Docking 8.0. Coluna Substituída por Galp: Substituição de β-D-galactofuranose por β-D-galactopiranosose. Coluna sem Galf: β-D-galactofuranose removida da estrutura. Galp: β-D-galactopiranosose; Galf: β-D-galactofuranose; Nac: n-acetilglucosamina; (β1 → 6) - ligação β1-6; (β1 → 4) - ligação β1-4. Retângulos verdes correspondem aos dockings que melhor apresentaram energia de interação com a estrutura química avaliada e com treonina livre As moléculas foram construídas de acordo com a representação esquemática de Acosta Serrano et al. (1995).